THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. MICHEL GOLDBERG

1re THÈSE. "Sur le mécanisme d'action et l'interaction entre les sous-unités de la tryptophane synthétase d'Escherichia coli K 12."

2e THÈSE. Propositions données par la Faculté.
"Relations entre la séquence d'aminoacides et la structure tridimensionnelle des protéines. Etat de la question."

Soutenues le 7 Janvier 1967 devant la Commission d'examen

MM.	**MONOD**	*Président*
	DEDONDER	*Examinateurs*
	LABOUESSE	

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE Grade DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. MICHEL GOLDBERG

1re THÈSE. "Sur le mécanisme d'action et l'interaction entre les sous-unités de la tryptophane synthétase d'Escherichia coli K 12."

2e THÈSE. Propositions données par la Faculté.
"Relations entre la séquence d'aminoacides et la structure tridimensionnelle des protéines. Etat de la question."

Soutenues le 7 Janvier 1967 devant la Commission d'examen

MM.	**MONOD**	*Président*
	DEDONDER	*Examinateurs*
	LABOUESSE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

JANVIER 1966

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEURS

Le Doyen : M. ZAMANSKY

PRENANT	T	Anatomie & histologie comparée
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie & Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
AUGER	T	Physique quantique & relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique E.N.S.
CARTAN	T	Mathématiques E.N.S.
LAFFITTE	T	Chimie générale
N...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique E.N.S.
EPHRUSSI	T	Génétique
GAUTHERET	T	Biologie végétale CPEM
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique CPEM
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie & dynamique de l'atmosphère
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
BENARD	T	Chimie appliquée
DUGUE	T	Statistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie & histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANCON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géographie physique, géologie dynamique
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
PISOT	T	Technique mathématique de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique & Théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie & diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique & structurale
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minérallogie & cristallographie
J.P. MATHIEU	T	Physique optique
CHOQUET	T	Théorie des fonctions & topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités & physique mathématiques
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel & intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétal
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique)
BRELOT	T	Analyse supérieure
NORMANT	T	Synthèse organique
COUTEAUX	T	Cytologie
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.E.	T	Chimie organique physique
LAMOTTE	T	Zoologie E.N.S.
OLMER	T	Energétique générale
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale
CURIEN	T	Minéralogie & cristallographie
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nucléaire & radio-activité
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie CPEM
FREYMANN	T	Recherches physiques
ROLLET	T	Chimie minérale
Mlle JOSIEN	T	Chimie SPCN
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique & théorie des groupes

LENNUIER	T	Physique M.G.P.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques M.P.C.
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL PY	T	Biologie végétale CPEM
PANNETIER	T	Chimie générale I
BRUN	T	Mécanique des fluides I
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques II E.N.S.
BELLAIR	T	Géologie S.P.C.N.
BOUISSIERES	T	Radiochimie
Mme COUTURE	T	Thermodynamique & mécanique physique
FRANC	T	Biologie animale CPEM
SCHNELL	T	Botanique tropicale
STOLKOWSKI	T	Physiologie générale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale CPEM
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOUREAU	T	Botanique
CURIE D.		Physique MGP
DURAND DELGA	T	Géologie
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie SPCN
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire
Mlle FOURCROY		Biologie végétale SPCN
Mme CHOQUET-BRUHAT		Mécanique analytique & mécanique céleste
Mlle VEIL	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique & expérim.
CABANNES	T	Mécanique générale
CAIRE	T	Géographie physique & géologie dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
HOUILLON		Biologie animale CPEM
OLIVIER		Anthropologie
SAMUEL	T	Mathématiques (ENS Jeunes Filles)
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES	T	Physique SPCN
AMAT	T	Thermodynamique
BALKANSKI		Physique M.P.C.
LE CORRE	T	Electricité
NATAF	T	Physique nucléaire & radio-activité
ECHALIER		Biologie animale CPEM
BARRAUD	T	Physique CPEM
DARS		Géologie structurale & appliquée
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales
BRICARD	T	Météorologie
Mme ALBE-FESSARD	T	Psycho-physiologie
M. JULIA	T	Etude des molécules naturelles complexes
MAGAT	T	Physico-chimie des rayonnements
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
CHATELET	T	Chimie CPEM
MATTLER	T	Physique SPCN
AUBOIN	T	Géologie
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire & radio-activité
BOUGIS		Biologie végétale marine Villefranche s/Mer
RIGAUDY	T	Chimie SPCN
COLLONGUES		Chimie CPEM
DUBERT		Biochimie
NOZIERES		Physique générale
CADIOT		Chimie organique
IVANOFF		Océanographie physique
FRANCOIS		Zoologie
TALBOT		Génie chimique
Mme NOUGAREDE		Botanique
BRUHAT	T	Mathématique MPC
FOURNET		Electricité générale
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutiques
FURON	T	Géologie SPCN
Mme GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale CPEM
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie organique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER	T	Pétrographie
MOREL F.	T	Physiologie comparée
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique E.S.E.
SILBER	T	Chimie CPEM
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique
TAVERNIER		Physique CPEM
DURAND Michel		Biologie animale SPCN
PASCAUD		Physiologie
Mme PETIT		Biologie animale CPEM
CAGNAC		Physique agrégation
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire
KRASNER	T	Mathématiques
BENZECRI	T	Statistiques
VINH MAU		Physique M.G.P.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546604_0093

SIGWALT	T	Chimie SPCN
BLAQUIERE		Electronique
BARUCH		Physique propédeutique
ARNOUS	T	Physique théorique
SLONIMSKI		Génétique
MALLIAVIN	T	Mathématiques propédeutique
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
MOREL P.		Physique MPC
LEFEBVRE		Chimie MPC
CHAPEVILLE		Biochimie
RIO		Chimie CPEM
PREVOST G.		Biologie végétale CPEM
Mme CHARNIAUX-COTTON		Evolution des êtres organisés
COHEN TANNOUDJI		Physique atomique
DUQUESNES		Physique CPEM
SCHUTZENBERGER		Programmation
TREMILLON		Chimie MPC
FAYARD		Chimie MPC
BUVET		Chimie CPEM
AUTHIER		Physique MPC
PICINBONO	T	Physique CPEM
BONNEFILLE		Electrotechnique
Mme PUISEUX DAO		Biologie végétale
LAZARD		Mathématiques MPC
ARSAC		Programmation
BOK		Physique propédeutique
BENOIT		Physique CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
FAVARD P.		Biologie animale CPEM
Mlle FICINI		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie

LE SECRETAIRE GENERAL

R. POULLAIN

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

PROFESSEURS

MANGENOT G.	T	Biologie végétale
JACQUINOT P.	T	Optique
GUINIER A.	T	Electricité & physique des solides
GRIVET P.	T	Electronique
BLANC-LAPIERRE A.	T	Accélérateur linéaire
L'HERITIER P.	T	Génétique des virus
LEMEE G.	T	Ecologie végétale
MOYSE A.	T	Physiologie végétale
DODE M.	T	Chimie thermodynamique
DENY J.	T	Mathématiques
RIVIERE A.	T	Géologie générale & sédimentologie
MICHEL A.	T	Chimie minérale
MAY R.	T	Anatomie comparée
DELANGE H.	T	Mathématiques
CHAPELLE J.	T	Physique expérimentale
LACOMBE P.	T	Métallurgie
BENOIT P.	T	Physiologie générale
GUINOCHET J.	T	Biologie végétale SPCN
NERON A.	T	Mathématiques
NOZERAN R.	T	Botanique approfondie
CASTAING R.	T	Thermodynamique
ELLENBERGER F.	T	Géologie structurale
LEDERER E.	T	Chimie biologique
RIZET J.	T	Génétique
LENDER T.	T	Biologie animale SPCN
POITOU G.	T	Mathématiques
FREON P.	T	Chimie organique
CHABRAL R.	T	Physique propédeutique
DELCROIX J.M.	T	Physique des plasmas
CERF J.	T	Mathématiques
D'ESPAGNAT B.	T	Physique théorique
SCHAEFFER P.	T	Microbiologie
Mme MARTY N.		Physique propédeutique
PEREZ-Y-JORBA		Physique propédeutique
RIOU M.		Physique nucléaire
LIORET C.		Physiologie végétale
JANCOVICI B.		Physique atomique
LE BERRE J.		Entomologie
PERIO P.		Physique propédeutique
CHEMLA M.		Chimie des isotopes
VILKAS M.		Chimie C.P.E.M.
BRUN G.		Génétique
ANDRE J.		Microscopie électronique
Mlle MARCOU		Biologie cellulaire C.P.E.M.
BERKALOFF A.		Biologie animale CPEM
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
BRUNN Jan	T	Géologie historique
JEAN M.	T	Physique nucléaire
BERGERARD J.	T	Zoologie
ROGER J.	T	Paléontologie
LEFORT M.	T	Chimie nucléaire
LAGARRIGUE A.	T	Physique des hautes énergies
JULLIEN J.	T	Chimie structurale organique
ARNULF A.	T	Optique
ROUAULT M.	T	Diffraction électronique
MARECHAL A.	T	Optique théorique et appliquée
MAZET R.	T	Mécanique générale
DAVID Serge	T	Chimie agrégation
GUERIN H.	T	Chimie des gaz et des combustibles
LESIEUR L.	T	Mathématiques MPC et algèbre
KOURGANOFF	T	Astronomie
ARNOULT P.	T	Physique électronique
KAHANE J.P.	T	Mathématiques
BROCHARD J.	T	Physique propédeutique
Mme ROIZEN	T	Physique C.P.E.M.
BERTEIN F.	T	Electronique
MALGRANGE B.	T	Mathématiques
CORABOEUF E.	T	Physiologie animale
FRIEDEL J.	T	Physique des solides
CHEVAUGEON J.	T	Cryptogamie
MEYER P.	T	Physique théorique & atomique
LEHMANN P.	T	Accélérateur linéaire
Mme LAMBERT		Physique C.P.E.M.
BIZOT J.C.		Physique M.P.C.
GUIRAUD J.P.		Mécanique
LABOUESSE B.		Chimie SPCN
DE GENNES P.	T	Physique des solides
GOURDIN M.		Physique théorique
GORENFLOT E.		Biologie végétale SPCN
BROUSSE R.		Géologie SPCN
CLAUSER H.		Chimie biologique
LURCAT J.		Physique propédeutique
LAVOREL J.		Biophysique
FETIZON M.		Stéréochimie
MAZIERES C.		Chimie SPCN
BLANDIN A.		Physique des solides
MERCOUROFF		Physique agrégation
CHEVALLIER F.		Physiologie animale
BOURDU R.		Physiologie végétale
Mlle LEFORT M.		Biologie cellulaire CPEM

Ce n'est pas uniquement pour suivre une tradition que je débute cette thèse par quelques mots de remerciements à ceux qui ont suscité et guidé mes efforts. C'est bien plus pour tirer parti de l'occasion qui se présente de leur exprimer les sentiments qui m'attachent à eux.

M. Jacques MONOD m'ouvrit la voie de la Biologie en me faisant découvrir les attraits et les perspectives de cette science dont j'ignorais jusqu'à l'ABC avant de le rencontrer ; c'est donc avec le plus grand plaisir que je m'adresse à lui.

L'exemple de rigueur intellectuelle et d'imaginativité qu'il sut me donner a sans aucun doute été le facteur déterminant dans l'aboutissement de ce travail. Ce n'est pourtant pas au savant, mais bien plutôt à l'homme que je voudrais exprimer ici les profonds sentiments d'admiration et d'affection que je ressens à son égard.

M. Edwin LENNOX m'a appris les aspects techniques de la recherche et a guidé mes premiers pas de biologiste. Il a su admirablement adapter sa propre expérience pour faciliter ma reconversion à la biologie. Il l'a fait avec tant d'attention bienveillante, tant de dévouement et tant de patience qu'il serait ingrat de ne pas lui en être reconnaissant. Plus encore que la reconnaissance, c'est un sentiment de cordiale amitié qui m'attache à lui.

Robert BALDWIN a été mon maitre et mon guide le plus sûr dans l'exécution de la partie physico-chimique de ce travail ; la remarquable qualité de ses connaissances et de l'enseignement dont il m'a permis de profiter ont stimulé en moi des exigences de précision dans l'expérience et dans la pensée, précision sans laquelle la physico-chimie ne saurait être.

Charles YANOFSKY pour m'avoir si généreusement accordé son temps et Lubert STRYER pour avoir participé aux expériences sur la fluorescence ne sauraient être oubliés ; je garde des trop rares moments passés avec eux le souvenir d'une cordiale et exaltante collaboration.

Je désire enfin remercier M. le Professeur DEDONDER et M. LABOUESSE pour l'honneur et le plaisir qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

Rappel de quelques propriétés fondamentales de la tryptophane de E. Coli 5

CHAPITRE I - MATERIEL ET TECHNIQUES 9

CHAPITRE II - COMPOSITION DU COMPLEXE ACTIF 13

A - Masse moléculaire de la sous-unité β_2 14

B - Rapport des masses de α et β dans le complexe . . 17

C - Masse moléculaire du complexe 25

D - Discussion 26

CHAPITRE III - NATURE DU COMPLEXE $\alpha_2 \beta_2$ FORTEMENT ASSOCIE 27

A - Composition du complexe 28

B - Réversibilité de la liaison entre $\alpha_2 \beta_2$ et la sérine . 30

CHAPITRE IV - DETERMINATION PRATIQUE DE LA CONCENTRATION DE β_2 32

CHAPITRE V - IDENTIFICATION SPECTRALE D'INTERMEDIAIRES . . 39

A - Identification d'un intermédiaire fluorescent 39

1°) Propriétés optiques de β_2 40

2°) Propriétés optiques de β_2 en présence de sérine . 41

a - étude des spectres 41

b - interprétation 44

3°) Détermination de l'affinité apparente de β_2 pour la sérine 45

4°) Propriétés optiques de β_2 en présence de α et de sérine 47

5°) Signification probable du complexe fluorescent . . 48

B - Identification d'un complexe fortement coloré 51

1°) Formation du complexe coloré 51

2°) Composants exigés pour l'apparition du complexe . 53

3°) Stoechiométrie de la formation du complexe . . . 54

4°) Influence du β-ME sur l'activité enzymatique . 61

5°) Caractérisation physique du complexe 62

6°) Position sur l'enzyme du site responsable de l'absorption 64

7°) Signification probable du complexe 64

8°) Structure probable du chromophore 69

CHAPITRE VI - MECANISME PROPOSE DE L'ACTION DE LA TRYPTOPHANE-SYNTHETASE 73

APPENDICE - Interprétation des affinités apparentes entre la sérine et β_2 79

CONCLUSION 82

BIBLIOGRAPHIE 88

INTRODUCTION

Au cours de la dernière décade, la liste des protéines globulaires dont on sait qu'elles sont composées de plusieurs sous-unités (identiques ou non) s'est allongée considérablement. Ce type de structure polymérique est même devenu si commun que lorsque la masse moléculaire d'une protéine dépasse 100 000 on a tendance (à tort parfois) à la supposer polymérique. Certaines hypothèses ont été émises sur l'importance physiologique de la structure quaternaire des enzymes polymériques, principalement en ce qui concerne la régulation métabolique de leur activité catalytique. Le cas le plus suggestif qui ait été étudié est sans doute celui de l'ATC-ase (Gerhart et Schachman, 1965) : cette protéine est constituée de 4 sous-unités "catalytiques" et de 4 sous-unités "régulatrices" ; les propriétés de catalyse d'une part et de spécificité pour l'effecteur d'autre part, sont propres à chaque type de sous-unité respectivement. C'est l'interaction entre les deux types de sous-unités qui induit les propriétés de régulation de l'enzyme.

D'une manière plus générale la coopérativité entre molécules de substrat ou d'effecteur, qui se traduit par une modification importante de l'activité enzymatique sous l'effet d'une faible variation de concentration de l'un des ligands, est une propriété qui n'a jusqu'à présent pu être attribuée qu'à des enzymes

polymériques. En particulier, l'une des hypothèses fondamentales de la théorie de l'allostérie (Monod, Wyman et Changeux, 1965) est que l'enzyme doit être un polymère.

Malgré ces progrès dans la compréhension du rôle physiologique des agrégats protéiques, très peu de faits précis ont été accumulés sur l'aspect physique de la formation de ces agrégats. Les problèmes posés sont pourtant nombreux : quelle est la stoechiométrie exacte de l'interaction protéines-protéines ? Quels en sont les aspects thermodynamiques (constantes d'association, vitesses d'association et de dissociation ...) ? Quel est le mécanisme de l'interaction (type des liaisons formées, spécificité de reconnaissance des sous-unités...) ? Quel est le mécanisme par lequel l'interaction modifie les propriétés catalytiques des sous-unités ?

Les expériences décrites ci-dessous ont été entreprises dans l'espoir de répondre à certaines de ces questions dans le cas de la tryptophane-synthétase d'E. Coli.

Dans la première partie, la stoechiométrie de l'agrégation est examinée et la structure du complexe actif est déterminée.

La seconde partie traite de la nature d'un complexe particulier entre les sous-unités de la trytophane-synthétase : le complexe irréversible formé en présence de l'un des substrats de l'enzyme, la L-sérine.

La troisième partie, purement technique, traite de la détermination de la concentration de l'une des sous-unités à l'aide de son spectre d'absorption. C'est une étude indispensable pour les expériences ultérieures.

La quatrième partie est l'étude des propriétés spectrales du pyridoxal - 5' - phosphate lié à l'enzyme dans diverses conditions. La raison initiale de cette étude était la recherche d'une propriété optique des chaines peptidiques susceptibles d'être modifiée lorsque les sous-unités entrent en interaction. L'échec successif des diverses techniques essayées (spectres différentiels d'absorption, spectres de fluorescence, dispersion rotatoire, etc.) a fait dévier cette étude vers la recherche d'une propriété optique du coenzyme qui soit modifiée au cours de l'interaction, dans l'espoir que cette modification serait due spécifiquement et uniquement à l'in- l'interaction entre les sous-unités. Là encore, les techniques énumérées ci-dessus n'ont donné aucun résultat. Néanmoins, lorsque la L-Sérine, un des substrats de l'enzyme, est ajoutée à une solution de protéine, les propriétés spectrales du PLP sont profondément modifiées. Il s'est avéré que les nouveaux types spectraux sont caractéristiques de divers complexes "enzyme-intermédiaire" dans la réaction de synthèse du tryptophane.

La cinquième partie présente un modèle de séquence de réactions partielles qui s'effectuent sur la protéine, au cours de la synthèse enzymatique du tryptophane. Ce modèle introduit une explication vraisemblable de l'irréversibilité du complexe

décrit dans la deuxième partie, et du mécanisme par lequel l'interaction entre les sous-unités agit sur l'activité catalytique de l'enzyme.

Avant d'entrer dans le détail de ce travail, il est bon de rappeler quelques-unes des propriétés de la tryptophane-synthétase de E. Coli, et d'expliquer pourquoi cet enzyme a été choisi pour cette étude.

Rappel de quelques propriétés fondamentales de la tryptophane-synthétase de E. Coli

Les quelques propriétés décrites dans ce paragraphe vont montrer pourquoi la tryptophane-synthétase de E. Coli est un système particulièrement bien adapté au genre d'études envisagées plus haut.

Avant tout, c'est un système polymérique, comme l'ont montré Crawford et Yanofsky (1958). L'enzyme est constitué de deux types de sous-unités, récemment rebaptisées α (produit du gène A) et β_2 (produite par le gène B).

La protéine α, dont la séquence d'acides aminés est maintenant connue, est un monomère de masse moléculaire 29 500 (Henning et al. 1962) dont le coefficient de sédimentation est $s_{20,w} = 2,7$ S (Creighton et Yanofsky, 1966). Elle peut catalyser la réaction suivante :

(1) $\quad InGP^{(*)} \rightleftarrows$ Indol + 3 PGA

soit quand elle est seule, soit lorsqu'elle est complexée avec la sous-unité β_2.

(*) Abréviations utilisées dans le texte :
InGP = Indol-3-glycérolphosphate
3PGA = 3 phosphoglycéraldéhyde
PLP = pyridoxal-5'-phosphate
β-ME = β-mercaptoethanol

La protéine β_2 est un dimère (Wilson et Crawford, 1964) dont le coefficient de sédimentation est $s_{20,w} = 5,4$ S (Creighton et Yanofsky, 1966). Chaque sous-unité β_2 fixe deux molécules de PLP, vraisemblablement sous la forme d'une base de Schiff entre la fonction aldéhyde du PLP et un groupe aminé de la protéine (Wilson et Crawford, 1965). Cette protéine peut catalyser la réaction suivante :

(2) Indol + L-Sérine → L-Tryptophane

soit quand elle est seule, soit lorsqu'elle est complexée avec la sous-unité α .

Elle peut également, mais uniquement en l'absence de α , catalyser la réaction :

(2 bis) L-Sérine → pyruvate + ammoniac + H_2O

Ces deux réactions ne peuvent être catalysées qu'en présence de PLP.

Enfin, le complexe formé par les sous-unités α et β_2, dont le coefficient de sédimentation est $s_{20,w} = 6,4$ S, catalyse la réaction :

(3) InGP + L-Sérine → L-Tryptophane + 3 PGA

en présence de PLP.

L'une des propriétés les plus frappantes de ce système est que lorsque la chaine α est saturée par la sous-unité β_2, l'activité par mole de α dans la

réaction (1) est 100 fois plus grande que lorsque α est seule. De même, l'interaction entre α et β_2 a pour effet d'augmenter d'un facteur 30 à 50 l'activité spécifique de β_2 dans la réaction (2).

TABLEAU I

Réaction	Enzyme	Activité relative par chaine peptidique
InGP $\rightleftarrows$ Indol + 3 - PGA	α	0,01 %
	$\alpha_2 \beta_2$	1 %
Indol + Sérine $\rightarrow$ Tryptophane	β_2	3 %
	$\alpha_2 \beta_2$	100 %
InGP + Sérine $\rightarrow$ Tryptophane + 3 - PGA	$\alpha_2 \beta_2$	30 %
Sérine $\rightarrow$ Pyruvate + NH_3 + H_2O	β_2	1 %
	$\alpha_2 \beta_2$	< 0,001%

L'ensemble de ces propriétés enzymatiques, décrites par Yanofsky (1960), place la tryptophane-synthétase de E. Coli dans le cadre des enzymes polymériques pour lesquels l'interaction entre les sous-unités produit d'importantes modifications des propriétés catalytiques des monomères. D'autre part, l'existence de très nombreux mutants bactériens produisant des formes altérées de α ou de β_2 permet

d'envisager la possibilité d'étudier l'influence du remplacement d'un acide aminé par un autre dans l'une des deux espèces de sous-unités.

Cet ensemble de faits a déterminé le choix de la tryptophane-synthétase de E. Coli comme sujet de l'étude présentée ici.

CHAPITRE I

MATERIEL ET TECHNIQUES

1°) Origine des enzymes

La sous-unité α a été isolée d'extraits de E. Coli 5927 R 38, purifiée et cristallisée d'après la méthode de Henning, Helinski, Chao et Yanofsky (1962). Cette purification a été effectuée par le Dr. C. Yanofsky qui a bien voulu nous fournir toute la protéine α nécessaire à l'aboutissement de nos travaux.

La sous-unité β_2 a été isolée d'extraits de E. Coli $A_2/F'A_2$. Cette souche a été préparée et fournie par le Dr. I.P. Crawford. Les extraits bactériens ont été traités conformément à la méthode de Wilson et Crawford (1965).

2°) Ultracentrifugations.

Elles ont été effectuées à l'aide d'une ultracentrifugeuse SPINCO, modèle E, équipée d'un contrôle de température. L'optique Schlieren a été alignée en utilisant le procédé de La Bar et Baldwin (1962), et une solution de sucrose de concentration connue a été utilisée pour vérifier l'exactitude des constantes optiques. L'optique U.V. a été modifiée de la façon suivante : la lampe U.V. a été

remplacée par une lampe à filament de tungstène ; le filtre de brome a été remplacé par un filtre à interférences dont la bande passante, de 4 mμ de large, était centrée à 468 mμ. L'optique a été réglée d'après le procédé de Schachman et al. (1962). Pour les mesures de masses moléculaires de β_2 et du complexe ($\alpha + \beta$), la méthode d'Archibald (1947) a été utilisée. La vitesse du rotor était 12 590 tours par minute. La concentration initiale a été mesurée en utilisant une cellule à frontière préformée (double secteur, du type à capillaire).

Pour la détermination du rapport des masses de α et β_2 dans le complexe ($\alpha + \beta$), les frontières ont été formées par centrifugation à grande vitesse (59 780 tours par minute). Une cellule à double secteur a été utilisée ; les deux secteurs étaient remplis également (par pesée) l'un de tampon, l'autre de solution de la protéine étudiée.

Les diagrammes Schlieren obtenus ont été étudiés à l'aide d'un micro-comparateur Gaertner.

Les volumes partiels spécifiques des protéines ont été calculés d'après les compositions en acides aminés, et les résultats de Mc. Meekin et Marshall (1952).

3°) Gradients de sucrose.

La méthode utilisée est celle de Martin et Ames (1961). Le marqueur de coefficient de sédimentation était l'albumine de sérum de boeuf liée à un colorant

fluorescent (Rinderknecht, 1962). Les centrifugations, d'une durée de 20 heures, à 38 000 tours minutes ont été effectuées dans une SPINCO modèle L, avec un rotor à godets basculants (SW. 39).

4°) Analyses d'amino-acides.

Elles ont été effectuées avec un analyseur Beckman/Spinco.

Chaque échantillon, d'un millilitre, contenait approximativement 30 mμ-moles de chaque amino-acide.

5°) Spectres d'absorption.

Un spectrophotomètre enregistreur Cary 15, parfois équipé d'une échelle étalée, a été utilisé. Les échantillons, d'un volume de l'ordre de 0,75 ml, étaient placés dans des cuvettes en quartz, de 0,5 cm x 1 cm de section.

6°) Spectres de fluorescence.

Ils ont été déterminés sur le spectrofluoromètre enregistreur construit par le Dr. L. Stryer. La dépolarisation de fluorescence a été mesurée sur ce même appareil.

7° Dosages d'activité enzymatique.

Les méthodes de Smith et Yanofsky (1962) ont été utilisées.

8°) Mesure des concentrations de protéine.

La détermination des concentrations de protéine à l'aide de leur absorption à 280 mμ a été faite en utilisant pour coefficients d'extinction celui de Henning et al. (1962) pour α, et celui déterminé dans le quatrième chapitre ci-dessous pour β_2.

CHAPITRE II

COMPOSITION DU COMPLEXE ACTIF

Le premier pas dans la compréhension des diverses interactions entre les protéines composant la molécule active de la Tryptophane-Synthétase est l'étude du nombre de chaque sous-unité qui entre dans le complexe actif.

Cette étude est compliquée par le fait que les sous-unités α et β_2 sont en équilibre d'association conformément à une équation :

$$n\alpha + \frac{m}{2}\,\beta_2 \rightleftarrows \alpha_n\,\beta_m$$

Suivant les conditions de l'interaction, la constante de cet équilibre est plus ou moins élevée (Creighton et Yanofsky, 1966). Dans toute expérience destinée à déterminer la structure $\alpha_n\,\beta_m$, il faut se placer soit dans des conditions où l'espèce qu'on étudie est uniquement l'espèce $\alpha_n\,\beta_m$, soit dans des conditions où la dissociation de $\alpha_n\,\beta_m$ est négligeable et n'influe pas sur la mesure. Nous verrons plus loin comment ces conditions ont été réalisées.

La démarche logique qui nous a conduit à la détermination du nombre de sous-unités de l'enzyme complet est la suivante : la masse moléculaire de la

chaine α étant connue (Henning et al. 1962), la mesure de la masse moléculaire de β et celle du rapport entre les masses de α et de β dans le complexe permettent de déterminer le rapport du nombre de chaines peptidiques α au nombre de chaines peptidiques β dans ce complexe. Ce résultat peut être obtenu avec une grande précision et assigne une composition au protomère. La mesure même approximative de la masse moléculaire du complexe détermine alors sans ambiguité le nombre de protomères qui forment l'enzyme complet.

Cette méthode a été appliquée et a donné les résultats décrits dans les paragraphes suivants.

A - Masse moléculaire de la sous-unité β_2

Le produit du gène B de la tryptophane-synthétase de E. Coli est une protéine qui dans un solvant non dénaturant se présente sous la forme d'un dimère que l'on désigne par β_2. (Wilson et Crawford, 1964). C'est la masse moléculaire de ce dimère qui va être mesurée.

Afin de déterminer si la sous-unité β_2 est une espèce stable qui ne se dissocie pas ou ne forme pas d'oligomères d'ordre plus élevé que 2 dans le domaine de concentration où nos expériences ont été effectuées, nous avons mesuré sa masse moléculaire dans trois tampons très différents. Ces mesures ont été faites en utilisant la méthode d'Archibald (1947). La même masse moléculaire de 99 000 $\pm$ 2 000 a été trouvée dans les trois tampons (Tableau II).

TABLEAU II

Masse moléculaire du dimère β_2

Tampon	Masse moléculaire
0.125 M phosphate de potassium	101 000
0.2 M $(Tris)_3$ - citrate	98 500
0.2 M $(Tris)_3$ - citrate + 0.66 M $(NH_4)_3$ - citrate	99 000

Tous ces tampons sont à pH et contiennent 10^{-3} M de β - ME et 5 μ g/ml de PLP.

Lorsqu'on discute de la précision des mesures faites par la méthode d'Archibald, il est fondamental de préciser le genre d'extrapolation utilisée pour trouver la valeur de $\frac{\partial c}{\partial r}$ au ménisque : pour que la mesure soit précise, il faut :

1°) que l'extrapolation soit linéaire,

2°) que la valeur de $\frac{\partial c}{\partial r}$ trouvée par extrapolation soit proche de la valeur de $\frac{\partial c}{\partial r}$ au point le plus rapproché du ménisque pour lequel la mesure de $\frac{\partial c}{\partial r}$ est directement possible.

La figure I (a) montre cette extrapolation pour l'une des mesures de la masse moléculaire de β_2. On peut voir que les deux critères ci-dessus sont

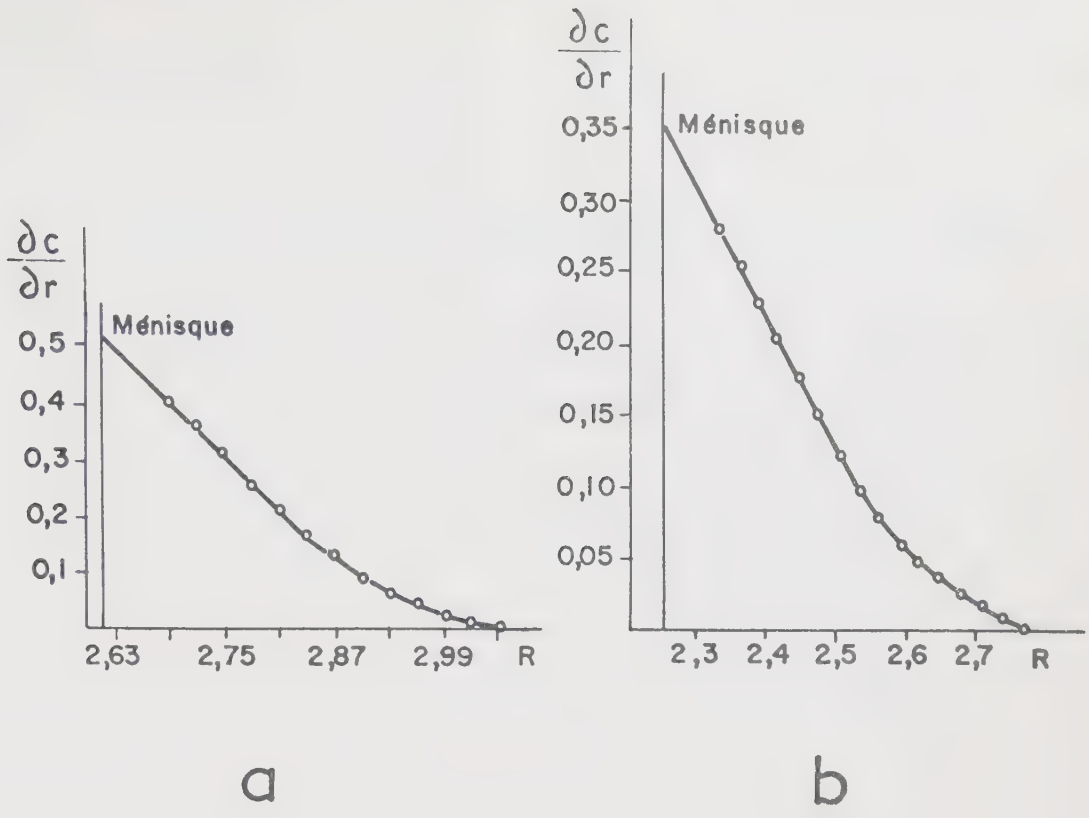


Fig. 1 - Mesure des masses moléculaires de :

a) le dimère β_2 à 2,70 mg/ml, dans du triscitrate pH 7,8 , 0,2 M , 0,001 M β- ME , 5 µg/ml PLP. Cliché obtenu 77 minutes après accélération.

b) le complexe (α + β) , à 1,65 mg/ml de α et 2,65 mg/ml de β_2 dans du tris-HCl pH 7,8 et 0,1 M , 0,001 M β - ME , 5 µg/ml PLP, et 0,01 M L-Sérine. Cliché obtenu 54 minutes après accélération.

Cette figure montre les extrapolations de $\frac{\partial c}{\partial r}$ au ménisque. $\frac{\partial c}{\partial r}$ et R sont donnés en cm sur la plaque photographique. R est compté à partir d'une origine arbitraire.

La vitesse du rotor était 12 590 tours/min., la température 25°C , et l'angle Schlieren 65°.

satisfaits. Les conditions utilisées (faible vitesse et temps de centrifugation relativement long) sont fondées sur une étude de la méthode d'Archibald par La Bar (1963).

B) Détermination du rapport des masses de α et β dans le complexe.

Le rapport des masses de α et β dans le complexe peut être déterminé directement par des expériences de sédimentation à grande vitesse, en utilisant le fait qu'il y a une grande différence entre les coefficients de sédimentation de la sous-unité α (2,7 S) et du complexe $\alpha + \beta$ (6,4 S). Le problème majeur est de trouver des conditions dans lesquelles une dissociation, ou un plus grand degré d'association du complexe sont négligeables. Les conditions utilisées ci-dessous sont fondées sur le travail de Creighton et Yanofsky (1966) qui ont trouvé que, en présence de 0,02 mM de PLP et 0,15 mM de L-Sérine, les sous-unités α et β_2 forment un complexe stable qui ne se dissocie pas même aux très faibles concentrations de protéines (à peu près 10^{-7} M) qu'ils utilisent dans leurs centrifugations en gradient de sucrose. Dans ce même solvant, et à des concentrations de protéines 500 fois plus élevées, nous avons trouvé le même coefficient de sédimentation (6,4 S) pour le complexe $\alpha + \beta$ dans une étude à la centrifugeuse analytique. Ces résultats excluent la possibilité d'un équilibre d'association-dissociation interférant avec les mesures.

1°) Théorie de la mesure.

Trois expériences de centrifugation sont nécessaires à la mesure, et une quatrième fournit une vérification des résultats. Deux solutions séparées, l'une de α,

l'autre de β_2, sont dialysées contre un même tampon. La concentration de chaque dialysat est déterminée en formant une frontière entre la solution de protéine et le tampon, soit en utilisant une cellule à frontière synthétique à faible vitesse de centrifugation, soit par sédimentation à grande vitesse. Cette dernière méthode est plus précise que la première ; c'est donc celle que nous avons choisie. La surface délimitée par le diagramme Schlieren est mesurée et corrigée de la dilution radiale en la multipliant par $(\frac{r_b}{r_o})^2$ ou r_b est la distance de la frontière à l'axe de rotation et r_o celle du ménisque à l'axe de rotation. Soit A°_α et A°_β les valeurs corrigées de ces surfaces pour les protéines α et β_2. La relation entre A°_α et la concentration de α est :

$$A^\circ_\alpha = C^\circ_\alpha \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_\alpha k \cot g\theta$$

où C°_α est la concentration de α

$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_\alpha$ est l'incrément spécifique d'indice de réfraction de α

k est une constante optique de la centrifugeuse

θ est l'angle de la plaque de phase de système Schlieren.

De même :

$$A^\circ_\beta = C^\circ_\beta \left(\frac{\partial n}{\partial c_\beta}\right) k \cot g\ \theta$$

Ensuite, des volumes V_α et V_β des deux solutions sont mélangés. Pour augmenter la précision, les dilutions sont contrôlées par pesée. Pour connaître la concentration C_α de α dans ce mélange, il suffit de multiplier C°_α par $f_\alpha = \frac{V_\alpha}{V_\alpha + V_\beta}$

De même :

$$C_\beta = C^\circ_\beta \, f_\beta = C^\circ_\beta \, \frac{V_\beta}{V_\alpha + V_\beta}$$

Le mélange est à son tour centrifugé à grande vitesse. On obtient deux frontières : la plus rapide correspond au complexe $\alpha + \beta$; la plus lente à la sous-unité en excès dans le mélange. Si β_2 était en excès, la faible différence entre les coefficients de sédimentation de β_2 (5,7 S ; cf. Creighton et Yanofsky, 1966) et ($\alpha + \beta$) (6,4 S) ne permettrait pas de bien séparer les frontières. Par contre, si α est en excès, la séparation est complète comme on peut le voir sur la fig. 2a .

Appelons alors $C_{(\alpha+\beta)}$ et C^e_α les concentrations respectives du complexe ($\alpha+\beta$) et de la sous-unité α libre, corrigées pour tenir compte de la dilution radiale :

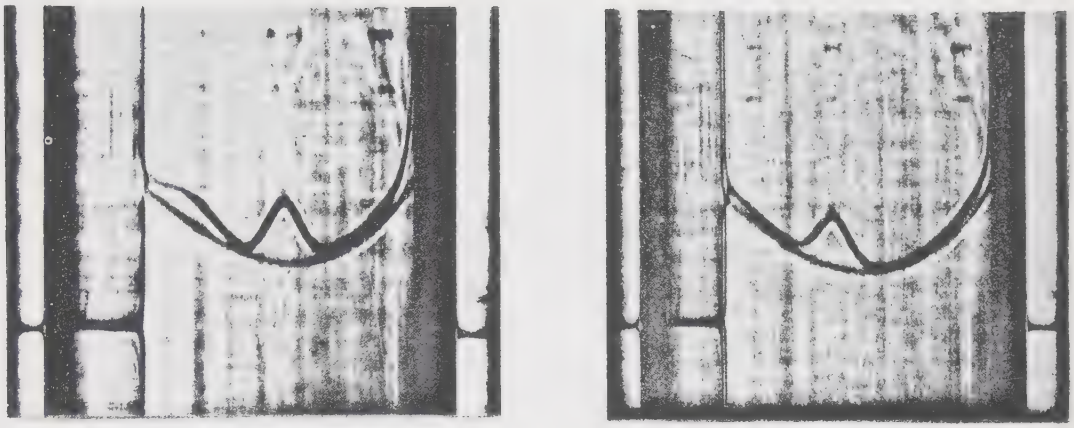
$$A_{(\alpha+\beta)} = C_{(\alpha+\beta)} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{(\alpha+\beta)} k \cot g \, \theta$$

$$A^e_\alpha = C^e_\alpha \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_\alpha k \cot g \, \theta$$

Dans ces conditions :

a - La concentration de la sous-unité α qui s'est combinée avec β, soit $C^{comp.}_\alpha$, est alors :

$$C^{comp}_\alpha = C_\alpha - C^e_\alpha = f_\alpha \, C^\circ_\alpha - C^e_\alpha$$



a b

Fig. 2 - Analyse du complexe formé en mélangeant α et β_2

Vitesse du rotor : 59 780 tours/minute. Température 25°C. Angle Schlieren 65°. Tampon : 0,2 M phosphate de potassium (pH 7,8), 0,001 M β - ME, 0,01 M L-Sérine et 5 μ g/ml de PLP. La sédimentation se fait de gauche à droite :

a) la sous-unité α est en excès (4,80 mg/ml de α et 2,62 mg/ml de β_2). Cliché obtenu 85 minutes après accélération.

b) mélange quasi stoechiométrique (1,60 mg/ml de α et 2,62 mg/ml de β_2). Cliché obtenu 70 minutes après accélération.

b - Comme le mélange contient un excès de α , et que le solvant est tel que la dissociation du complexe ($\alpha + \beta$) est négligeable, on peut légitimement admettre que toutes les sous-unités β_2 sont dans le complexe ($\alpha + \beta$).

c - La concentration du complexe ($\alpha + \beta$) doit alors être égale à la concentration de sous-unité β_2 augmentée de la concentration de α combinée. Soit :

$$C_{(\alpha+\beta)} = C_\beta + C_\alpha^{comp.}$$

Nous pouvons alors conclure que le rapport R_m de la masse de β à la masse de α dans le complexe est :

$$R_m = \frac{C_\beta}{C_\alpha^{comp}} = \frac{C_\beta}{f_\alpha C^\circ_\alpha - C^e_\alpha} = \frac{C_\beta}{C_{(\alpha+\beta)} - C_\beta}$$

Si nous supposons que, avec une précision suffisante,

$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_\alpha = \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_\beta = \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{\alpha+\beta}$, les valeurs des concentrations sont proportionnelles aux valeurs des surfaces correspondantes dans les diagrammes Schlieren appropriés (corrigées pour la dilution radiale).

Alors :

$$R_m = \frac{f_\beta A^\circ_\beta}{f_\alpha A^\circ_\alpha - A^e_\alpha} = \frac{f_\beta A^\circ_\beta}{A_{(\alpha+\beta)} - f_\beta A^\circ_\beta}$$

Dans ce calcul, deux approximations ont été faites ; nous allons les justifier :

a) L'idendité des valeurs de $\frac{\partial n}{\partial c}$ pour les trois espèces de protéines considérées n'est pas rigoureuse. Pourtant, à condition qu'elles ne contiennent que des amino-acides, toutes les protéines ont des incréments spécifiques d'indice de réfraction identiques (à $\pm$ 3 % près) (Mc. Meekin, Wilensky et Groves, 1962). Le calcul de $(\frac{\partial n}{\partial c})_\alpha$ et $(\frac{\partial n}{\partial c})_\beta$, utilisant les données de Mc. Meekin et al. (1962) et les compositions en acides aminés de la chaine α (Henning et al. 1962) et de la sous-unité β_2 (Goldberg et al. 1966) montre que ces valeurs ne diffèrent effectivement pas de plus de 3 %. Les valeurs trouvées sont :

$$(\frac{\partial n}{\partial c})_\alpha = 0,171$$

$$(\frac{\partial n}{\partial c})_\beta = 0,176$$

dans le solvant utilisé dont l'indice de réfraction est 1,344.

Nous développerons plus loin la méthode de calcul de $\frac{\partial n}{\partial c}$.

b) Nous n'avons pas tenu compte de l'effet Johnston - Ogston (1946) dont l'effet est de sous-estimer la valeur du rapport R_m. Mais cet effet est ici du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales à cause des relativement faibles concentrations de protéines, et de la grande différence entre les coefficients de sédimentation de α et de $(\alpha + \beta)$. (cf. Johnston et Ogston, 1946).

2° - Résultats.

Les résultats obtenus au cours d'une série d'expériences sont consignés dans le tableau suivant. Les valeurs indiquées ont été obtenues par deux mesures pour chaque frontière correspondant à des photographies prises à 65° et 70° d'angle Schlieren :

Surface mesurée	A x cotg θ (1)	
$f_\alpha A^\circ_\alpha$	45,7	45,8
$f_\beta A^\circ_\beta$	25,8	26,2
A^e_α	29,0	29,1
$A_{\alpha + \beta}$	41,9	42,0

(1) Surfaces exprimées en mm^2 corrigées pour la dilution radiale, multipliées par cotg θ . Ces valeurs doivent être indépendantes de θ.

De ce tableau, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

a) $A^{comp}_\alpha = f_\alpha A^\circ_\alpha - A^e_\alpha = 16,7\ mm^2$

b) $A_{\alpha + \beta}$ doit, comme nous l'avons vu plus haut, être égal à :

$$f_\beta A^\circ_\beta + A^{comp}_\alpha = 42,7\ mm^2$$

La valeur expérimentale est 42 mm^2. L'accord entre ces deux valeurs est très satisfaisant.

c) $R_m = \frac{f_\beta \, A^\circ_\beta}{A^{comp}_\alpha} = 1,56$

Avec les valeurs 29,500 et 99,000 pour les masses moléculaires de α et β_2, on trouve alors que le rapport du nombre de chaines α au nombre de chaines β dans le complexe est : $\frac{\alpha}{\beta} = 1,04$.

En conclusion, ces expériences indiquent qu'une chaine peptidique α se combine avec une chaine peptidique β.

3° - Vérification expérimentale de ce résultat.

Le rapport trouvé ci-dessus a été utilisé pour préparer un mélange stoechiométrique de chaines α et β. Si la valeur du rapport est correcte, on s'attend à ne trouver au cours d'une centrifugation à grande vitesse, qu'une seule frontière correspondant au complexe ($\alpha + \beta$). L'expérience suivante a pour but de vérifier cette prédiction.

Nous avons vu que la séparation des frontières de β_2 et de ($\alpha + \beta$) n'est pas possible ; pour être sûr que β_2 n'est pas en excès il faut donc pouvoir distinguer la présence d'un excès de α. Dans ce but, un mélange de α et de β_2 a été préparé de telle sorte qu'il contienne un excès de 4 % de α par rapport au mélange stoechiométrique prévu sur la base de $R_m = 1,56$.

Ce mélange quasi-stoechiométrique a été centrifugé à grande vitesse. La figure 2b montre l'aspect du diagramme Schlieren ; ce diagramme montre un léger

excès de chaine α (peut-être un peu plus que 4 %, mais la surface est trop petite pour être mesurée avec précision). La surface correspondant à la frontière du complexe (α + β), corrigée de l'effet secteur et de la dilution due au mélange, est la même, à 2 % près, que celle obtenue dans l'expérience précédente.

Ce résultat était attendu puisque à une même quantité de β_2 doit correspondre une même quantité de (α + β) si β_2 est entièrement complexé.

C - Masse moléculaire du complexe

Sachant que le complexe (α + β) contient une chaine α pour une chaine β on peut prédire que la masse moléculaire du complexe doit être un multiple entier n de la somme des masses moléculaires de α et de β ; soit : n x 79 000. Le nombre n sera le nombre de chaines α (et de chaines β) qui constituent le complexe.

La masse moléculaire du complexe (α + β) a été déterminée par la méthode d'Archibald appliquée à un mélange stoechiométrique de α et β_2 (1,95 mg/ml de α et 3,20 mg/ml de β_2). En centrifugation à grande vitesse ce mélange ne montrait qu'une seule frontière sédimentant avec un coefficient de sédimentation $S_{20,w} = 6,4$ S. La masse moléculaire trouvée est 159 000.

La valeur du volume partiel spécifique du complexe (α + β) utilisée pour le calcul est la moyenne pondérée des volumes partiels spécifiques de α et de β_2

Comme on peut le vérifier sur la figure 1b les critères de précision discutés plus haut pour la méthode d'Archibald sont encore satisfaits.

La valeur trouvée pour la masse moléculaire de $(\alpha + \beta)$ correspond exactement au double de la masse moléculaire du protomère $\alpha\ \beta$.

Nous pouvons donc conclure que le complexe totalement associé comprend 2 chaines α et 2 chaines β. Le complexe sera dorénavant désigné par la notation $\alpha_2\ \beta_2$.

D - Discussion

Le rapport mesuré des masses de β_2 et de α qui entrent dans la composition du complexe actif de la Tryptophane-Synthétase de E. Coli, soit 1,56, est en excellent accord avec le rapport des masses moléculaires des chaines peptidiques β et α : 49 500/29 500 = 1,62.

C'est ce que l'on prévoit si la combinaison entre chaines peptidiques se fait mole à mole. La masse moléculaire du complexe, soit 159 000, est en très bon accord avec celle attendue pour deux chaines α (59 000) et deux chaines β (99 000). Ces résultats confrontés avec d'une part la comparaison des compositions en acides aminés des chaines α, β et du complexe $(\alpha + \beta)$ (Goldberg et al. 1966) et d'autre part les expériences de filtrage sur gel de Sephadex (Wilson et Crawford, 1965), laissent subsister peu de doute sur la structure du complexe totalement associé : deux chaines α et deux chaines β.

CHAPITRE III

NATURE DU COMPLEXE $\alpha_2 \beta_2$ FORTEMENT ASSOCIE EN PRESENCE DE L-SERINE

Creighton et Yanofsky (1966) ont montré que l'association entre les sous-unités α et β_2 de la tryptophane-synthétase de E. Coli est très fortement accentuée par l'addition de L-Sérine et de PLP dans la solution de protéines. Pour démontrer cela, ils sont superposé à un gradient de sucrose un mélange de sous-unités α et de sous-unités β_2 . Après centrifugation et analyse des gradients, ils ont pu mettre en évidence deux types de sédimentation :

a - Si le gradient ne contient ni L-Sérine, ni PLP, les deux sous-unités sédimentent sans interaction apparente, c'est-à-dire avec des coefficients de sédimentation identiques à ceux des sous-unités centrifugées isolément(soit 2,7 S et 5,4 S pour α et β_2 respectivement).

b - Si le gradient contient de la L-Sérine et du PLP les deux sous-unités sédimentent sans dissociation apparente avec un coefficient de sédimentation de 6,4 S identique à celui du complexe $\alpha_2 \beta_2$.

Ils ont également préincubé un mélange de sous-unités α et β_2 en présence de L-Sérine et de PLP, puis l'ont centrifugé dans un gradient de sucrose ne contenant d'autre additif que le tampon Tris-HCL et le saccharose. Ils ont observé que là encore les sous-unités sédimentent comme le complexe $\alpha_2 \beta_2$. Cela signifie que la préincubation en présence de L-Sérine et de PLP a produit une association irréversible, ou très lentement réversible, entre les sous-unités α et β_2.

A - Composition du complexe $\alpha_2 \beta_2$ fortement associé

Partant de cette observation, nous avons cherché à comprendre la nature de ce complexe irréversiblement associé. Dans ce but, l'expérience suivante a été réalisée.

Un mélange de sous-unités α et β_2 (α en excès) a été incubé à 37° C pendant 15 minutes, en tampon Tris-HCL $\frac{M}{20}$ pH 7,8 , en présence de 5 µg/ml de PLP et de L-Sérine $\frac{M}{1000}$ marquée au carbone 14 .

1 ml de ce mélange a été placé au sommet d'une colonne de Sephadex G-25 (20 cm de hauteur et 1 cm de diamètre), préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCL $\frac{M}{20}$ à pH 7,8 . L'élution a été poursuivie avec ce même tampon. Des fractions de 0,4 ml ont été collectées, et 50 µ l de chaque fraction ont été introduits dans une fiole contenant 8 ml d'un mélange à scintillation acceptant les solutions aqueuses (Bray, 1960). La radioactivité contenue dans chaque fraction a ainsi pu être déterminée. Les résultats sont indiqués sur la fig. 3 .

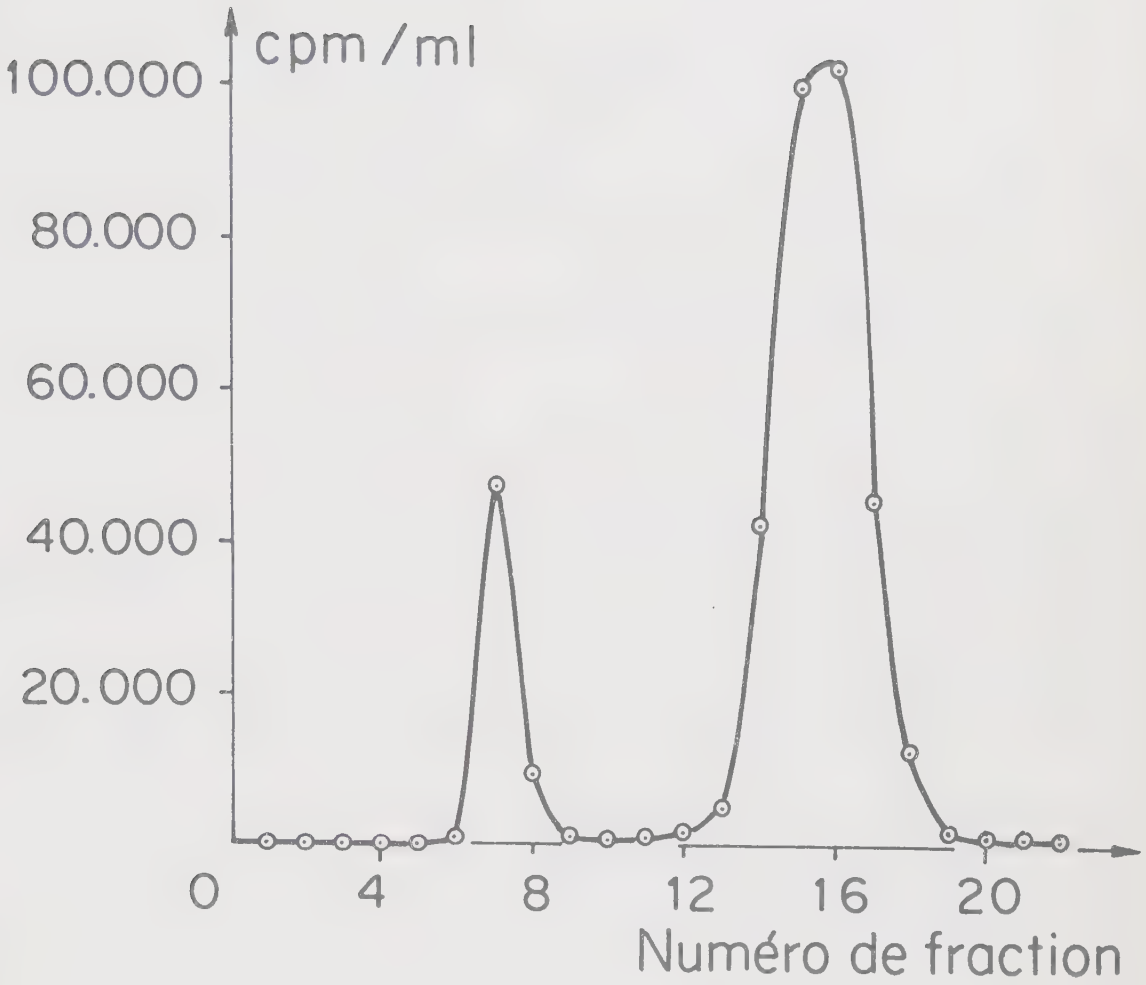


Fig. 3 - Diagramme d'élution du Sephadex G-25

On peut voir qu'en plus du pic de radioactivité retardée par la colonne (correspondant à la sérine libre), un pic non retardé est parfaitement séparé du précédent. L'activité enzymatique $\alpha_2\ \beta_2$ mesurée par la réaction :

$$\text{InGP} + \text{L-Sérine} \rightarrow \text{L-Tryptophane} + 3\ \text{PGA}$$

est éluée exactement de la même manière que la radioactivité non retardée.

On peut en conclure que la fraction radioactive non retardée est irréversiblement liée à $\alpha_2\ \beta_2$.

En calculant la quantité totale de radioactivité non retardée, et connaissant la radioactivité spécifique de la sérine, on a pu montrer que deux molécules de L-Sérine ont été irréversiblement liées à une molécule du complexe $\alpha_2\beta_2$. Ceci confirme qu'il existe deux sites actifs par molécule de $\alpha_2\ \beta_2$.

B - Etude de la réversibilité de la liaison entre $\alpha_2\ \beta_2$ et la sérine

Pour savoir si la sérine liée à $\alpha_2\beta_2$ est liée au site catalytique, ou bien à un site dont la seule fonction est d'assurer la cohésion du complexe $\alpha_2\beta_2$, l'expérience suivante a été réalisée : un aliquot de la fraction n° 7 (cf. fig. 3) de l'expérience précédente a été incubé en présence de 5 µg/ml de PLP et de $\frac{M}{100}$ Indol.

Après 15 minutes d'incubation, le mélange a été placé sur la colonne de Sephadex G-25 et élué comme ci-dessus. La radioactivité a été intégralement

libérée, sous forme de tryptophane (le tryptophane est retenu plus que la sérine sur le Sephadex, donc aisé à distinguer).

Ceci signifie que la sérine liée à l'enzyme est au site actif et est un intermédiaire dans la synthèse du tryptophane.

L'hypothèse pouvait être envisagée que la sérine était liée de manière covalente irréversible soit à α, soit à β, soit encore à α et à β. Pour vérifier cette hypothèse, un autre aliquot de la fraction n° 7 (cf. fig. 3), a été traité par de l'urée 8M afin de dénaturer l'enzyme. Cette fraction a alors été filtrée sur la même colonne de Sephadex G-25, et la répartition de la radioactivité à la sortie de la colonne a été étudiée.

La radioactivité a cette fois été entièrement retenue ce qui montre que la sérine a été libérée en solution, donc que l'hypothèse d'une véritable liaison covalente est inexacte.

En conclusion, on peut affirmer que le complexe fortement associé $\alpha_2 \cdot \beta_2$ contient deux molécules de L-Sérine par molécule de complexe. Ces molécules de sérine sont fixées aux sites actifs du complexe, de manière vraisemblablement non covalente mais pourtant irréversible.

Une interprétation possible de la nature de cette liaison sera donnée dans le chapitre VI.

CHAPITRE IV

DETERMINATION PRATIQUE DE LA CONCENTRATION DE β_2

Plusieurs des expériences de stoechimétrie décrites plus loin nécessitent une mesure précise et pratique de la concentration de β_2 dans une solution. Ces mesures reposent sur la connaissance du coefficient spécifique d'extinction à 278m μ de la sous-unité β_2 .

Ce chapitre traite de la détermination de ce coefficient.

Une solution de protéine β_2 est dialysée contre le tampon suivant : phosphate de potassium $\frac{M}{10}$ pH 7,8 , $\frac{M}{1000}\beta$ - ME , 5 μ g/ml · PLP. Le spectre d'absorption du dialysat est enregistré ; la cuvette de référence contient le tampon de dialyse (voir fig . 4) .

Ce même dialysat est alors centrifugé dans une cellule à frontière préformée ; le tampon de dialyse est superposé à la solution de protéine. En mesurant l'aire délimitée par le diagramme Schlieren de la frontière, on peut calculer la concentration de protéine dans la solution initiale à condition de connaître l'incrément spécifique d'indice de réfraction $\frac{\partial n}{\partial c}$ de la protéine β_2 dans le tampon utilisé.

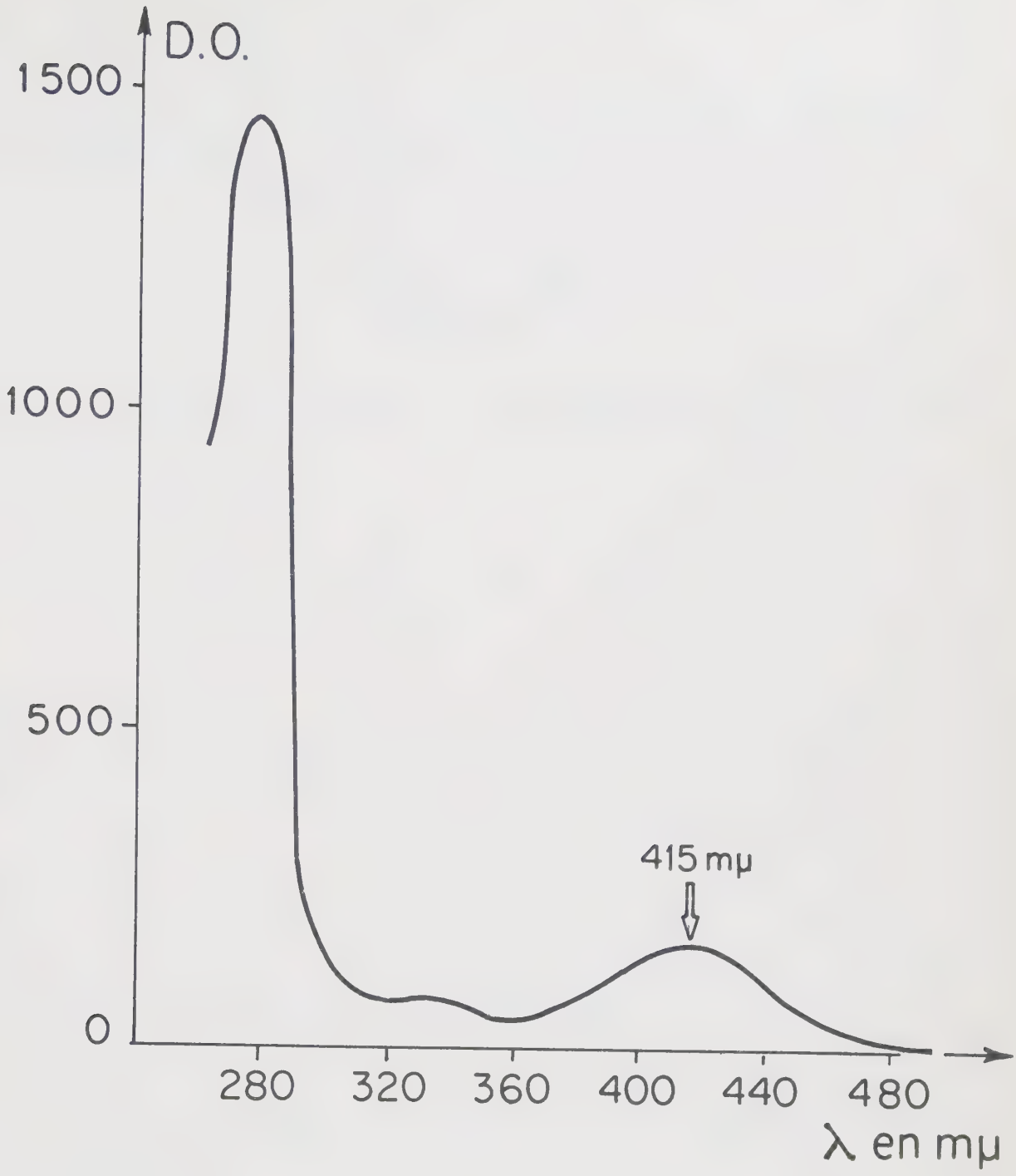


Fig. 4 - Spectre d'absorption du dimère β_2

2,6 mg/ml de sous-unité β_2 dans $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{100}$ β - ME et 5 μg/ml de PLP.

La détermination de $\frac{\partial n}{\partial c}$ a été effectuée de la manière suivante. Les travaux de Mc. Meekin et al. (1962) permettent de calculer l'indice de réfraction spécifique n_p d'une protéine si on connait sa composition en acides aminés ; on trouve que, pour β_2, la valeur de n_p est :

$$\boxed{n_p = 1{,}609}$$

Connaissant la valeur de n_p, on peut, pour calculer $\frac{\partial n}{\partial c}$, utiliser l'équation de Lorenz et Lorentz :

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{n_p^2 - 1}{n_p^2 + 2} \; c\bar{v} + \frac{n_o^2 - 1}{n_o^2 + 2} \; (1 - c\bar{v})$$

Dans cette équation n est l'indice de réfraction de la solution,

n_o est l'indice de réfraction du solvant,

c est la concentration de la protéine,

$\bar{v}$ est le volume partiel spécifique de la protéine qui peut être calculé d'après les travaux de Mc. Meekin et Marshall (1952).

De cette équation on peut déduire que, avec une approximation de l'ordre de 0,1 % :

$$\frac{\partial n}{\partial c} = \frac{\bar{v}}{2} \cdot \frac{n_p^2 - n_o^2}{n_o} \cdot \frac{n_o^2 + 2}{n_p^2 + 2}$$

Soit, pour β_2 :

$$\frac{\partial n}{\partial c} = 0{,}00176 \text{ dl/g}$$

lorsque le solvant est l'eau.

Les deux expériences précédentes permettent alors de connaitre le spectre d'absorption d'une solution de protéine β_2 de concentration déterminée. Donc de calculer les coefficients d'extinction spécifique, à diverses longueurs d'ondes, de l'enzyme saturé de coenzyme :

$$E_{278} = 0{,}560/\text{mg} \qquad E_{415} = 0{,}06/\text{mg} \qquad E_{450} = 0{,}02/\text{mg}$$

La mesure précise de la concentration de β_2 est compliquée par le fait que l'absorption à 278 mμ varie avec le degré de saturation de l'enzyme par le coenzyme.

Il faut donc tenir compte du PLP lié à l'enzyme ; l'extinction à 415 mμ étant caractéristique du PLP lié on peut, en mesurant la densité optique à 415 mμ déterminer la concentration de PLP lié à l'enzyme dans la solution.

L'application de ces considérations a permis d'établir une courbe de calibration qui établit la corrélation entre la densité optique à 278 mμ et le degré de saturation de l'enzyme.

Pour cela, une solution d'apoenzyme β_2 est préparée (Crawford et Ito, 1964) et dialysée contre du tampon phosphate de potassium $\frac{M}{10}$ (pH 7,8) et β - ME $\frac{M}{100}$. Son spectre d'absorption est enregistré. Des aliquots d'une solution concentrée de PLP sont ajoutés à la solution ainsi qu'au tampon de référence et, pour chaque concentration de PLP atteinte, le spectre d'absorption est enregistré. L'absorption dans la cuvette contenant la protéine est égale à la somme des absorptions de la protéine et du PLP libre. Pour connaitre l'absorption vraie de la protéine il faudrait que les concentrations de PLP libre (non lié à β_2) dans la solution de protéine et dans la solution de référence soient identiques. Lorsque des quantités égales de PLP ont été ajoutées aux deux cuvettes, ce qui a été maintenu est l'égalité des concentrations totales de PLP (lié + libre) ; la concentration de PLP libre dans la solution de protéine est donc d'autant plus faible que du PLP a été lié à β_2.

Dans l'interprétation des spectres obtenus ci-dessus, il faut donc tenir compte de ce fait et ajouter à l'absorption à chaque longueur d'onde la contribution qu'aurait donnée une concentration de PLP libre égale à la concentration de PLP lié à l'enzyme.

Pour déterminer la concentration de PLP lié à l'enzyme on peut utiliser l'observation qu'à 450 m μ, et dans les conditions de concentration utilisées, seul le PLP lié absorbe. Donc, la concentration de PLP lié est égale à :

$$\frac{A_{450}}{E_{450}}$$

où A_{450} est la densité optique mesurée de E_{450} est la densité optique spécifique de l'enzyme saturé. On peut donc corriger, à chaque longueur d'onde les spectres expérimentaux obtenus plus haut et connaitre le vrai spectre d'absorption de la protéine.

La fig. 5 montre, pour ces spectres corrigés, la dépendance de E_{278} vis-à-vis du degré de saturation de β_2 par le PLP.

Ces résultats permettent de mesurer la concentration (β_2) de la sous-unité β_2 dans une solution à partir de son spectre d'absorption en utilisant la formule suivante :

$$(\beta_2) = \frac{A_{415}}{E_{415}} + \frac{A_{278} - \frac{A_{415}}{E_{415}} \times E_{278}}{E^{apo}_{278}}$$

où A_{278} et A_{415} sont les absorptions mesurées

E_{278} et E_{415} sont les coefficients spécifiques d'extinction de l'enzyme

E^{apo}_{278} est le coefficient spécifique d'extinction de l'apoenzyme.

Pour avoir (β_2) en mg/ml :

$$(\beta_2) = 2{,}02\ A_{278} - 2{,}17\ A_{415}$$

Cette formule a été utilisée pour déterminer les concentrations de β_2.

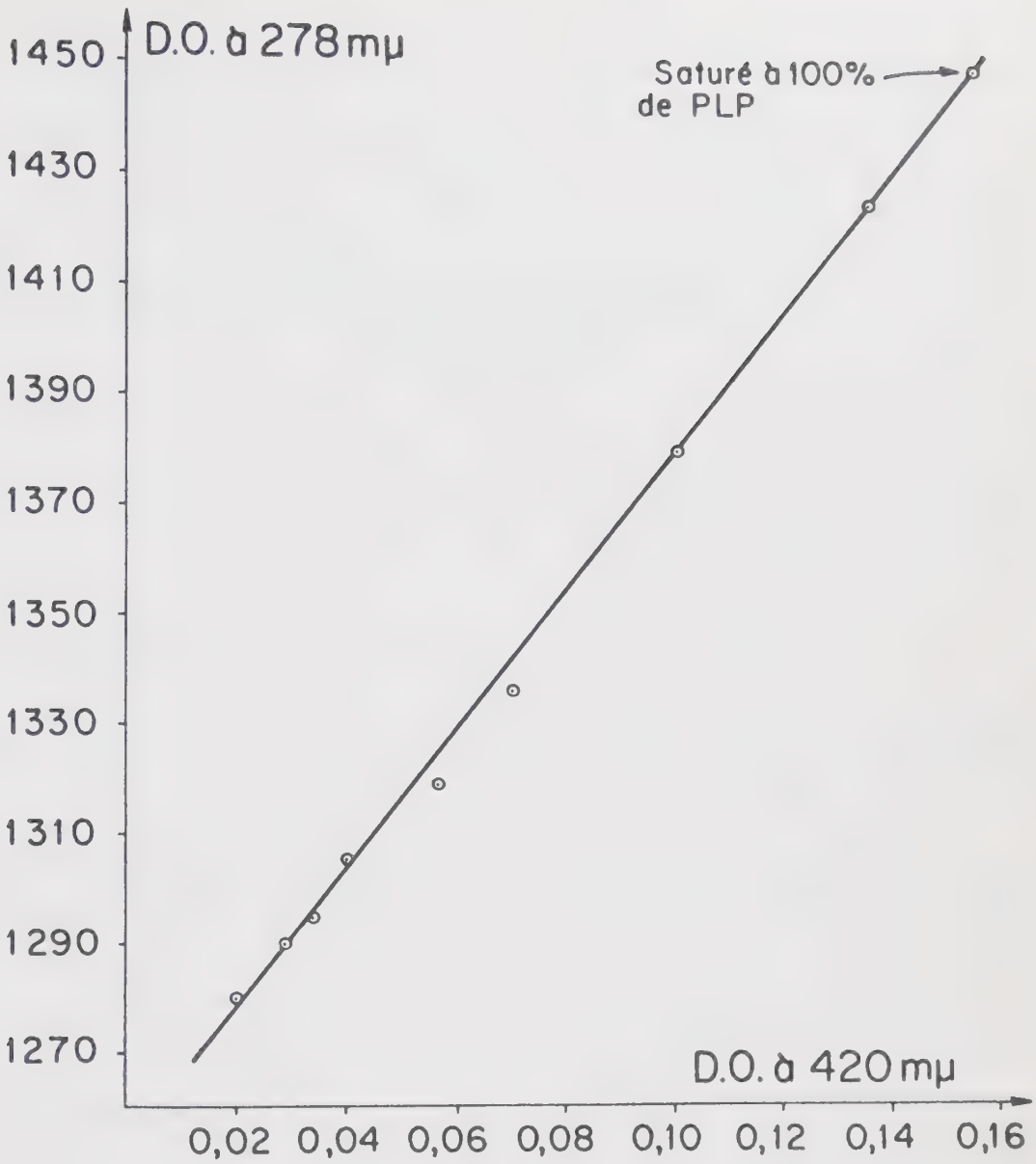


Fig. 5 - Absorption à 278 mμ d'une solution de sous-unité β_2 en fonction de son absorption à 415 mμ .

La solution contient 2,58 mg/ml de β_2 dans le tampon suivant : $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8) et $\frac{M}{100}$ β - ME.

CHAPITRE V

IDENTIFICATION SPECTRALE D'INTERMEDIAIRES LIES A L'ENZYME

La Tryptophane-Synthétase de E. Coli est un enzyme qui exige du PLP : ce coenzyme, lié à la sous-unité β_2 , est nécessaire au fonctionnement de l'enzyme comme catalyseur des réactions où la sérine est l'un des substrats.

Dans tous les mécanismes postulés de la catalyse par le PLP, les auteurs font appel à des structures dans lesquelles le PLP est lié de manière covalente au substrat, à des formes activées du substrat, ou au produit. Partant de cette hypothèse, nous avons étudié les spectres d'absorption et de fluorescence du PLP lié à l'enzyme en présence de sérine ; cette étude nous a conduit à l'identification de deux intermédiaires liés à l'enzyme dans la réaction de synthèse du tryptophane.

A - Identification d'un intermédiaire fluorescent.

Le PLP est lié spécifiquement à β_2 à raison d'une molécule par molécule de chaine β . (Wilson et Crawford, 1965) . On peut mettre en évidence le PLP lié à la protéine par l'étude du spectre d'absorption d'une solution de l'enzyme dialysé contre un tampon contenant du PLP. Un tel spectre est représenté sur la fig.4.

On peut voir qu'en plus de l'absorption à 280 mμ il existe deux bandes d'absorption, l'une centrée à 330 mμ et l'autre à 415 mμ . La bande centrée à 415 mμ est vraisemblablement due au PLP lié en base de Schiff à la fonction ε-aminée d'une lysine de la protéine. La bande centrée à 330 mμ correspond à une structure ininterprétée, mais créée par la fixation du PLP sur des molécules de chaine β inactives. Cette propriété a été démontrée en étudiant le spectre d'absorption d'une préparation dont l'activité spécifique était exceptionnellement élevée (3 100 unités/mg) : cette préparation ne présentait qu'une absorption à peine mesurable à 330 mμ . Au cours du vieillissement de la solution, l'augmentation de la densité otpique à 330 mμ était proportionnelle à la perte d'activité enzymatique de la protéine. D'autre part, le rapport des densités optiques à 330 et 415 mμ ne varie pas en fonction du pH dans les limites explorées ; c'est-à-dire entre pH 5,8 et 8,8 qui sont les pH limites de stabilité de l'enzyme. Ceci exclut l'hypothèse selon laquelle le PLP serait en équilibre entre deux formes absorbant à 330 et 415 mμ respectivement.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons étudier essentiellement les propriétés optiques de la sous-unité β_2 correspondant à l'espèce non inactivée, donc dans la région du spectre où les longueurs d'onde sont supérieures à 380 mμ .

1°) Propriétés optiques de la sous-unité β_2.

Les propriétés de fluorescence du PLP lié à β_2 qui ont été étudiées sont les suivantes : spectre d'excitation, spectre d'émission et dépolarisation de fluorescence.

Le PLP lié à la sous-unité β_2 est très faiblement fluorescent. Comme on peut le voir sur la figure 6, les longueurs d'onde des maxima d'excitation et d'émission sont respectivement 415 mμ et 505 mμ.

La polarisation de fluorescence a été mesurée de la manière suivante : si on appelle r le rapport des signaux des phototubes recevant la lumière respectivement parallèle et perpendiculaire à la lumière polarisée incidente, on définit le coefficient de polarisation P par :

$$P = \frac{r - 1}{r + 1}$$

On a trouvé pour la fluorescence de β_2 :

$$P = 0,35$$

Cette valeur élevée de la polarisation montre que le PLP est fortement lié à la protéine.

2°) Propriétés optiques de la sous-unités β_2 en présence de L-Sérine.

a) Etude des spectres.

Sur la figure 7, on peut voir le spectre d'absorption de la sous-unité β_2 en présence de L-sérine. En comparant ce spectre à celui de la figure 4, on constate que l'addition de sérine a produit un très léger déplacement du maximum d'absorption de 415 à 418 mμ.

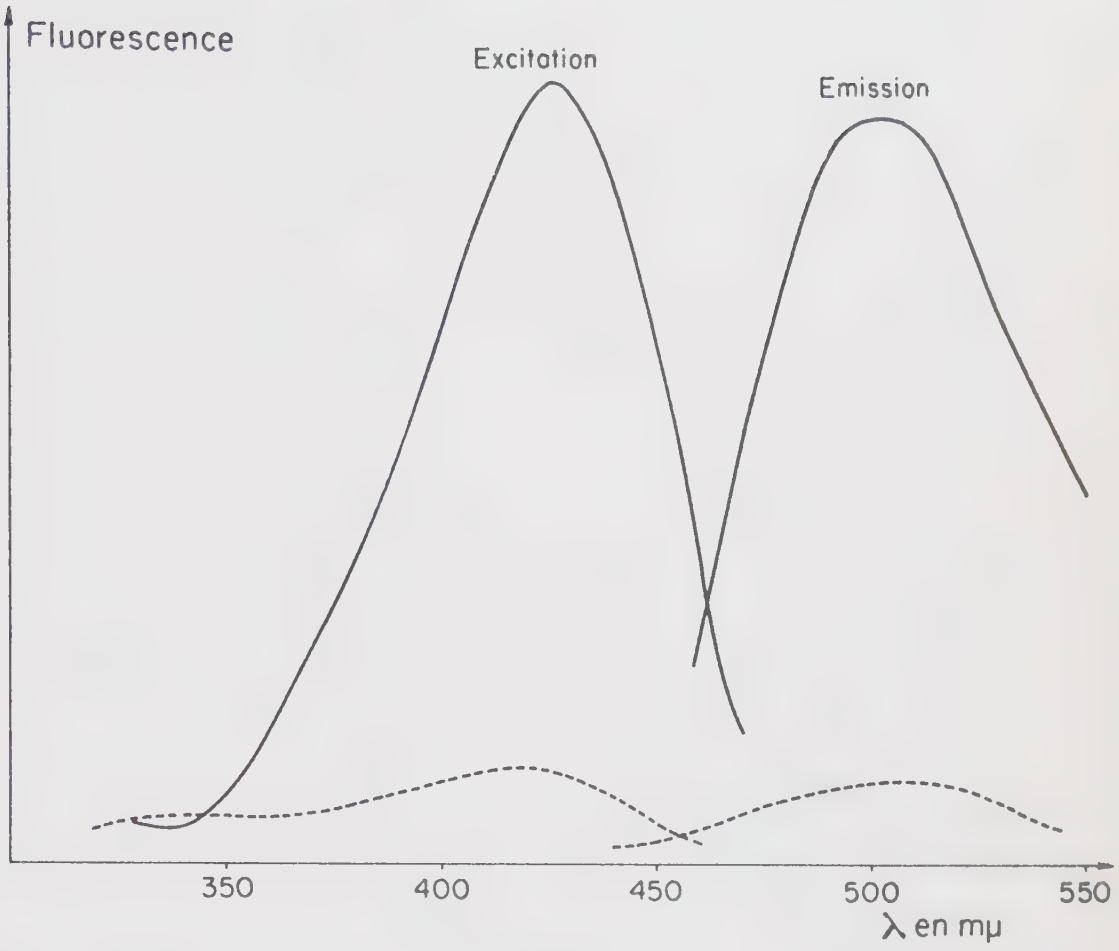


Fig. 6 - Fluorescence du dimère β_2

0,05 mg/ml de sous-unité β_2 dans $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{100}$ β- ME et 5 μ g/ml de PLP.

La fluorescence est portée en unités arbitraires.

- en pointillés : en l'absence de L-Sérine
- en traits pleins : en présence de $\frac{M}{100}$ L-Sérine.

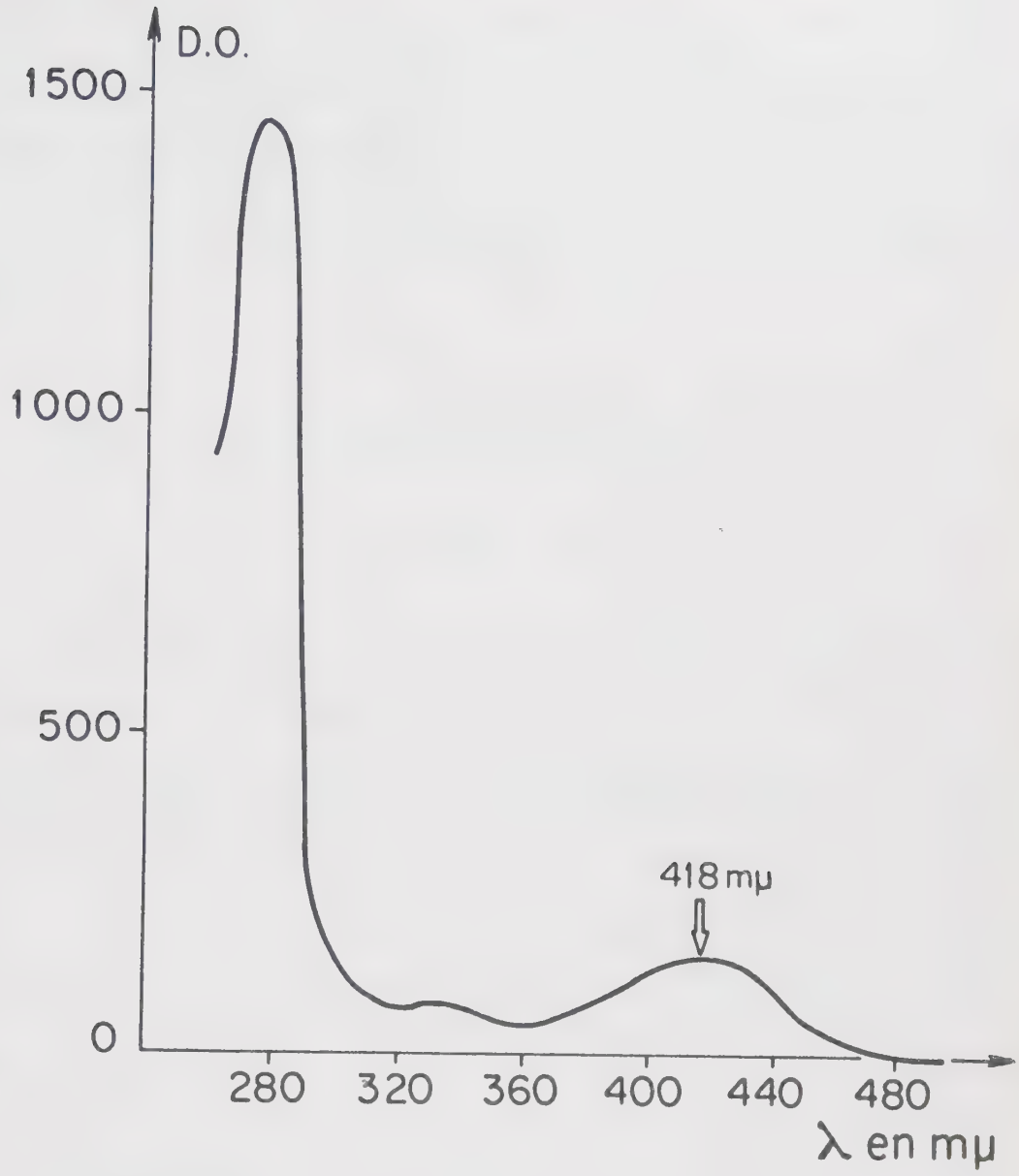


Fig. 7 - Spectre d'absorption du dimère β_2 en présence de L-Sérine

2,6 mg/ml de sous-unité β_2 dans $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{100}$ β - ME, 5 μg/ml de PLP et $\frac{M}{100}$ L-Sérine.

Les spectres de fluorescence d'une solution de β_2 en présence de L-sérine (voir figure 6) montrent par contre un changement beaucoup plus important des propriétés de fluorescence sous l'influence de la sérine : la longueur d'onde du maximum d'excitation est maintenant 424 mμ et celle du maximum d'émission est 500mμ. Mais surtout l'intensité de la lumière émise est considérablement augmentée.

D'autre part, la polarisation de fluorescence est

$$P = 0,43$$

Cette valeur encore plus élevée de P peut s'interpréter de deux manières différentes ; ou bien le PLP est encore plus rigidement lié à la protéine, ou bien le temps de relaxation de l'excitation de la fluorescence a été diminué. La durée de la demi-vie de l'excitation de la fluorescence a pu être mesurée en présence de L-sérine ; elle est égale à : 3,7 nanosecondes (Goldberg et Stryer). Elle n'a pu être mesurée en l'absence de sérine en raison du très faible rendement quantique observé dans ces conditions.

b) Interprétation.

Le fait que la solution présente des spectres d'absorption et d'excitation différents (maxima à 415 et 424 mμ respectivement) révèle une hétérogénéité d'états du PLP ; on peut admettre que le déplacement du maximum d'absorption de 415 à 418 mμ correspond en réalité à la superposition d'une bande centrée à

415 mμ et d'une autre centrée à 424 mμ. L'intensité de ces deux bandes correspond aux concentrations stationnaires des composés absorbant à ces deux longueurs d'onde : le PLP lié à la protéine (415 mμ) et un intermédiaire dans la réaction de désamination de la sérine (424 mμ).

3°) Détermination de l'affinité apparente de la sous-unité β_2 pour la L-sérine.

Une solution de sous-unité β_2 ($3,2 \cdot 10^{-6}$ M) a été dialysée contre du tampon phosphate de potassium (pH 7,8) $\frac{M}{100}$ β - ME et 5 μg/ml de PLP. Sa fluorescence à 500 mμ a été mesurée. Des aliquots d'une solution de L-sérine 10^{-1} M ont été ajoutés et la fluorescence à 500 mμ a été mesurée pour chaque valeur de la concentration de sérine. Les résultats de cette expérience sont montrés sur la figure 8 où l'inverse de la fluorescence a été porté en fonction de l'inverse de la concentration de sérine. On peut voir que la constante de dissociation apparente K obtenue par extrapolation est de l'ordre :

$$K = 1,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Cette constante de dissociation apparente est plus faible que la constante de Michaelis ($Km = 1,1 \cdot 10^{-2}$ M d'après Crawford et Ito, 1964) pour la L-sérine dans la réaction :

$$\text{L-sérine} \rightarrow \text{pyruvate} + NH_3 + H_2O$$

Cette réaction ne peut donc s'expliquer par un mécanisme simple conforme à l'hypothèse de Michaelis et Menten (1913) : si l'intermédiaire fluorescent était le

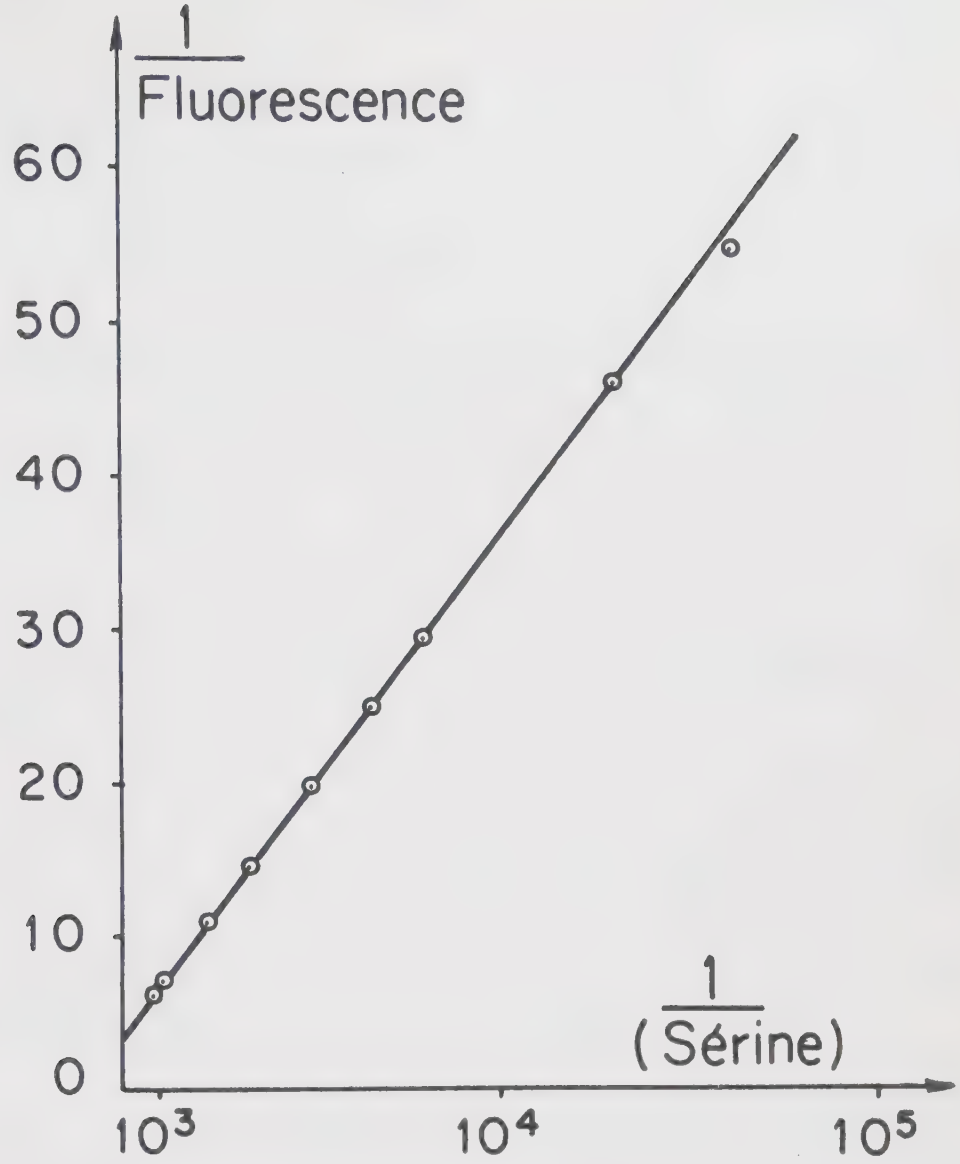


Fig. 8 - Affinité apparente de la sous-unité β_2 pour la L-Sérine

L'inverse de la fluorescence est porté (en ordonnées) en unités arbitraires.

complexe "enzyme-substrat" de Michaelis, la concentration Km de substrat pour laquelle l'activité enzymatique est la moitié de l'activité à concentration saturante de sérine devrait être égale à la concentration de sérine K pour laquelle l'intensité de la fluorescence est la moitié de l'intensité à concentration saturante.

Il faut donc supposer que la réaction de désamination de la L-sérine se fait en plus de deux étapes. Un modèle conforme à cette prédiction sera présenté au cours du chapitre VI.

4°) Propriétés optiques de la sous-unité β_2 en présence de chaine α et de L-sérine.

Le spectre d'absorption du PLP lié à la sous-unité β_2 n'est pas modifié lorsque β_2 est saturé de sous-unité α. Par contre, lorsque de la L-sérine est ajoutée au complexe $\alpha_2 \beta_2$ le spectre d'absorption du PLP lié à l'enzyme est modifié considérablement ; deux cas sont à distinguer :

a - du β - ME est présent ; le spectre observé est alors celui du "complexe ambré" étudié dans la seconde partie de ce chapitre.

b - sans β - ME ; l'absorption du PLP semble se délocaliser et s'étaler largement entre 350 et 450 mμ. Ce spectre est celui du complexe $\alpha_2 \beta_2$ irréversiblement lié à la sérine qui a été décrit au cours du chapitre III. A cette modification du spectre d'absorption du PLP lié correspond une modification des propriétés de fluorescence : si à une solution de sous-unités β_2 en présence de L-sérine

on ajoute un excès de chaines α on observe que la fluorescence du PLP lié à β_2 est complètement éteinte ; elle est même inférieure à celle du PLP lié à β_2 en l'absence de sérine. Ces propriétés sont indiquées sur la figure 9.

En mesurant l'extinction de la fluorescence à 500 mμ en fonction de la quantité de chaine α ajoutée à une solution de sous-unités β_2 en présence de L-sérine, on peut titrer β_2 par la chaine α. Le résultat d'une telle expérience est indiqué sur la figure 10. On peut voir que la saturation de β_2 a été obtenue lorsque 280 μ l d'une solution de α ($3{,}42 \cdot 10^{-5}$ M) ont été ajoutés à 3 ml d'une solution de sous-unités β_2 ($5{,}80 \cdot 10^{-6}$ M en chaines peptidiques β). Donc quand $1{,}71 \cdot 10^{-5}$ mmoles de α ont été ajoutés à $1{,}74 \cdot 10^{-5}$ mmoles de β.

Ceci montre encore une fois que l'association entre α et β se fait mole à mole.

5°) Signification probable du complexe fluorescent.

Nous avons vu plus haut que le complexe fluorescent formé entre β_2, le PLP et la sérine est vraisemblablement un intermédiaire dans la réaction de désamination de la sérine. La longueur d'onde du maximum d'absorption de ce chromophore (424 mμ) est identique à celle du maximum d'absorption d'une base de Schiff entre la sérine et le PLP. Bien que cette base de Schiff ne soit pas fluorescente quand elle est libre en solution, on peut admettre qu'elle le devient lorsqu'elle est fortement liée à la surface d'une protéine (voir la discussion du spectre de type II au début du chapitre VI).

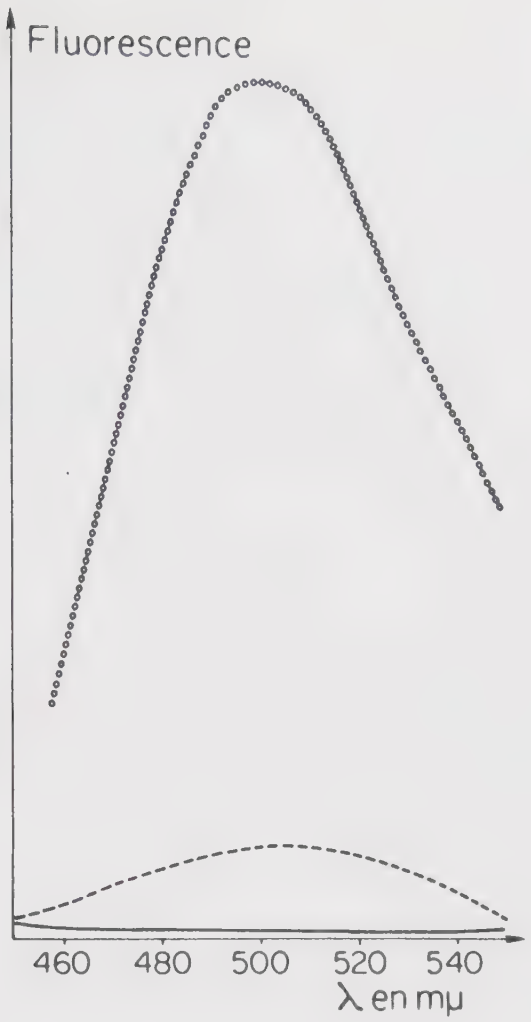


Fig. 9 - Spectre d'émission du complexe $\alpha_2 \beta_2$ en présence de L-Sérine

--------- 0,05 mg/ml de sous-unité β_2 dans $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8) $\frac{M}{100}$ β - ME et 5 μg/ml de PLP

oooooooo même solution + $\frac{M}{100}$ L-Sérine

———— même solution + $\frac{M}{100}$ L-Sérine + excès de chaine α .

Dans tous les cas, la longueur d'onde d'excitation est 365 mμ .

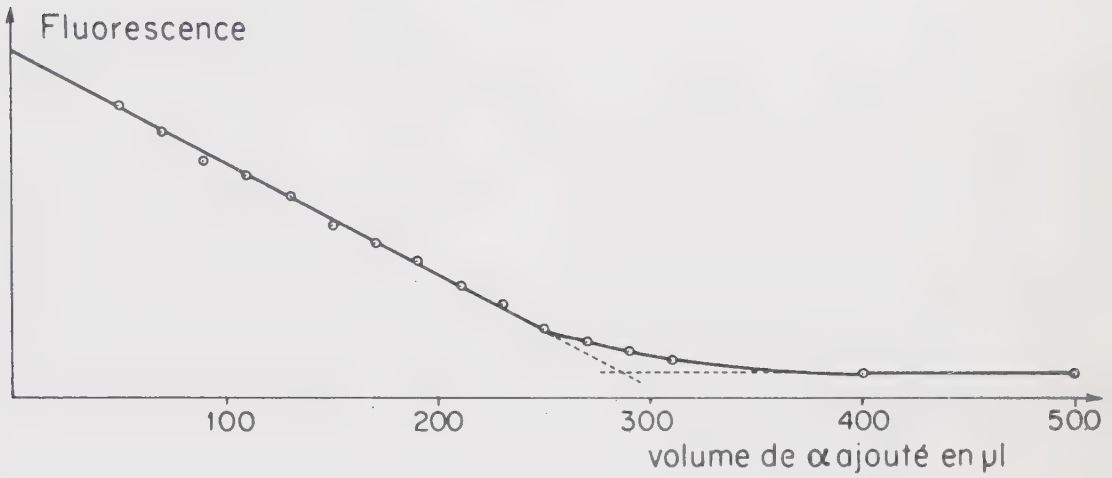


Fig. 10 - Saturation de β_2 avec α d'après la fluorescence

$1{,}74 \cdot 10^{-5}$ millimole de chaine β dans $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{100}$ β - ME, $\frac{M}{100}$ L-Sérine et 5 µ g/ml de PLP.

La solution de sous-unités α ajoutée par aliquots est $3{,}42 \cdot 10^{-5}$ M.

Nous admettrons donc que l'intermédiaire fluorescent est une base de Schiff entre le PLP et la sérine, fortement liée à la sous-unité β_2 (comme l'indique la valeur élevée de la polarisation de fluorescence).

B - Identification d'un complexe fortement coloré.

1°) Formation du complexe coloré.

Le spectre d'absorption d'un mélange de protéines α et β_2, dans un tampon contenant du phosphate de potassium, $\frac{M}{10}$ à pH 7,8, du β - ME $\frac{M}{10}$ et 5 μ g/ml de PLP, est montré en pointillés sur la figure 11. La cuvette de référence contient le même tampon. Les bandes d'absorption centrées à 330 et 415 mμ sont caractéristiques du PLP lié à l'enzyme, et sont identiques à celle du PLP lié à la sous-unité β_2 seule (sans α) dans le même tampon.

La figure 11 montre en traits pleins le spectre d'absorption de la même solution, mais de la L-sérine a été ajoutée à une concentration de 0,02 M. La même quantité de L-sérine a été ajoutée à la cuvette de référence.

La comparaison de ces deux spectres montre que la bande à 415 mμ a pratiquement disparu, alors qu'une nouvelle bande, très intense, centrée à 468 mμ est apparue. La bande à 330 mμ est demeurée inchangée.

Le complexe qui montre cette bande à 468 mμ sera nommé "complexe ambré" pour rappeler la couleur jaune ambré de la solution.

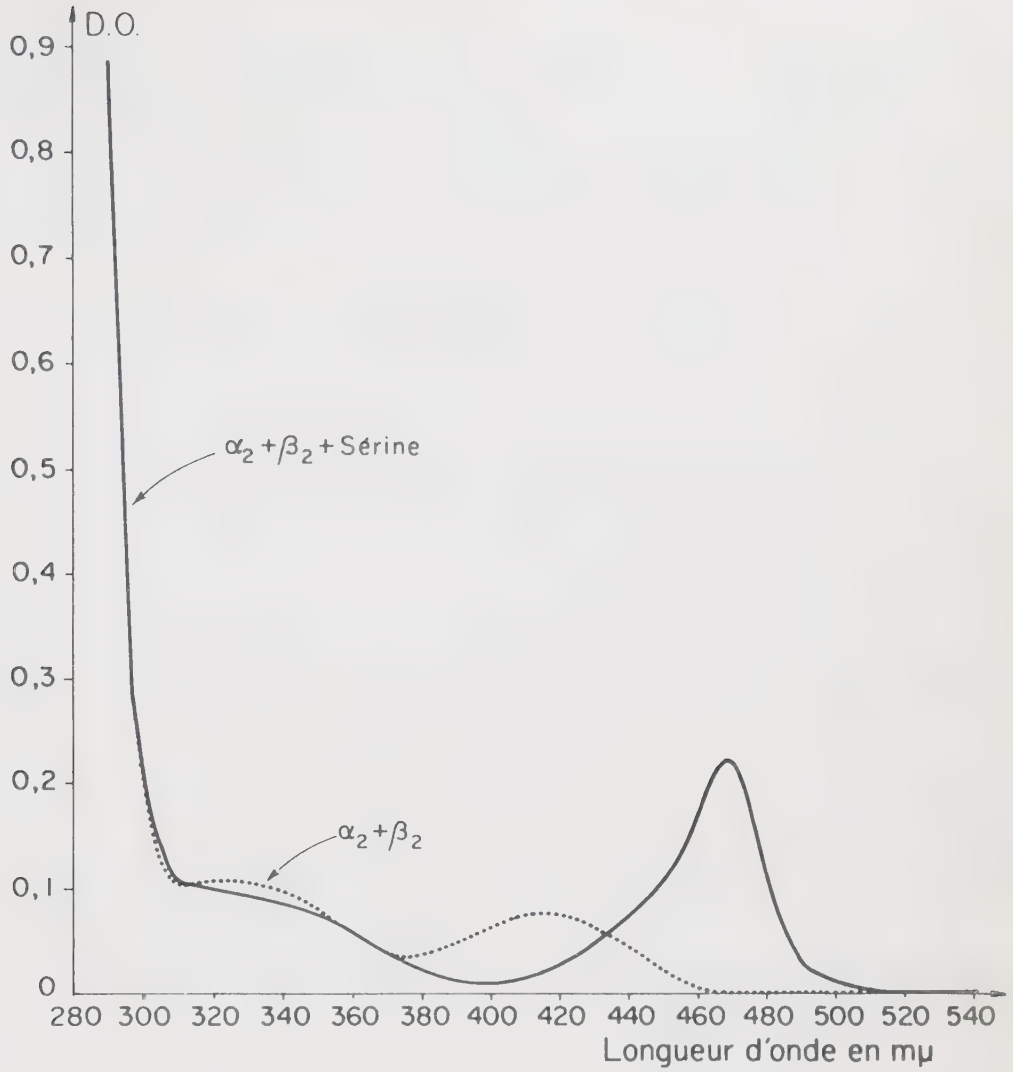


Fig. 11 - Spectre d'absorption du complexe α_2 β_2

2,6 mg de α et 1,6 mg de β_2 dans 1,2 ml de :

a) $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8) $\frac{M}{10}$ β - ME ,
5 μ g/ml PLP ;

b) le même tampon, et 0,02 M L-Sérine.

2°) Composants exigés pour l'apparition de la bande à 468 mμ.

La sous-unité β_2, en présence de PLP, L-Sérine, et β - ME, ne produit pas cette bande. Il en est de même pour la chaine α en présence de PLP, L-Sérine et β - ME.

Il faut donc que α et β_2 soient présents simultanément.

La méthode utilisée par Crawford et Ito (1964) a permis de préparer une solution d'apo-enzyme β_2 dépourvu de PLP. Cette solution a été mélangée à un excès de chaines α dans le tampon habituel contenant L-Sérine et β - ME. La bande à 468 mμ n'est pas apparue. L'addition ultérieure de PLP a permis de régénérer la bande. Ceci montre que le PLP est indispensable.

La L-Sérine est également requise et ne peut être remplacée ni par la D-Sérine, ni par la L-Cystéine qui est pourtant un substrat de l'enzyme (Crawford et Ito, 1964).

Pour des raisons qui apparaitront plus loin, le rôle du β-ME a également été étudié. Il s'est avéré que le β- ME est aussi indispensable et ne peut être remplacé ni par l'acide thioglycolique, ni par la β- mercaptoéthanolamine, ni par le glutathion, ni par le dithioérithritol (molécules donneuses de - SH), ni par l'éthanol (partie apolaire du β - ME).

3°) Stoechiométrie de la formation du complexe ambré.

Saturation de β_2 par α :

La figure 12 montre les résultats d'une expérience au cours de laquelle des aliquots d'une solution de chaine α (à 4,75 mg/ml) ont été ajoutés à 0,750 ml d'une solution de sous-unités β_2 (à 0,79 mg/ml). Le solvant est le tampon habituel contenant PLP, L-sérine et β - ME. Pour chaque aliquot de α ajouté, la densité optique à 468 mμ a été mesurée et portée en ordonnées en fonction de la quantité de α ajoutée au total. La saturation en α est atteinte lorsque 0,315 mg de α ont été ajoutés à 0,580 mg de β_2. Les masses moléculaires de α et β_2 étant respectivement 29 500 (Henning et al. 1962) et 99 000 (voir chapitre II) la saturation est atteinte lorsque une mole de chaine α a été ajoutée par mole de chaine peptidique β. Le complexe ambré contient donc une chaine α par chaine β.

Saturation de l'apoenzyme $\alpha_2\beta_2$ par le PLP :

L'apoenzyme β_2 a été mélangé à un excès de chaine α dans le tampon contenant la L-sérine et le β - ME. La concentration de chaine β était $3,90 \cdot 10^{-6}$ M. Des quantités croissantes de PLP ont été ajoutées à ce mélange ainsi qu'à la cuvette de référence et la densité optique à 468 mμ a été enregistrée pour chaque valeur de la concentration de PLP dans le mélange. La figure 13 montre la variation de la densité optique en fonction de la concentration de PLP ajouté. La saturation est atteinte lorsque 1,02 mole de PLP a été ajoutée par mole de chaine peptidique β. Le complexe ambré contient donc une mole de PLP par mole de chaine β.

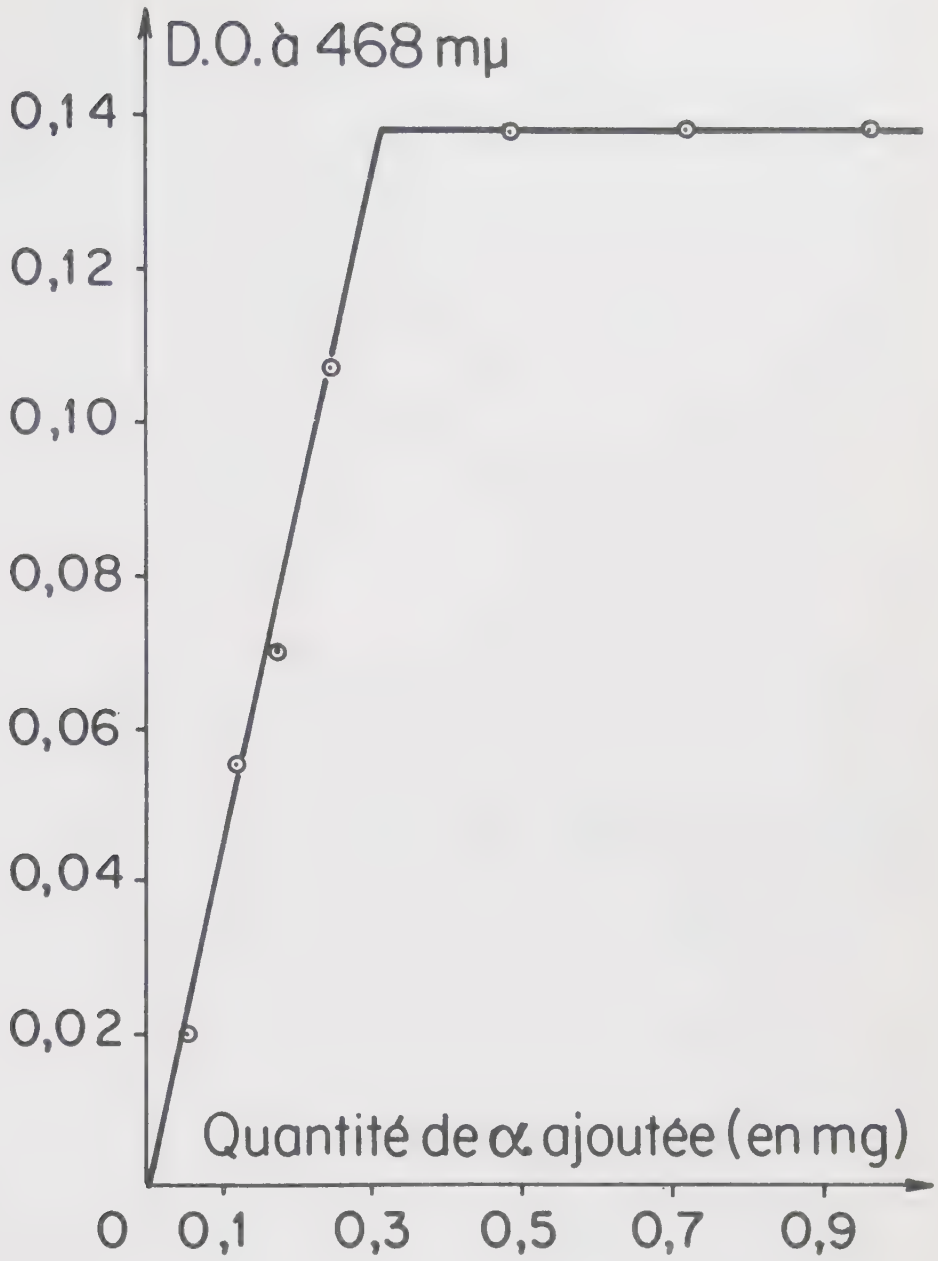


Fig. 12 - Saturation de β_2 avec α pour la formation du complexe ambré

La solution initiale contient 0,59 mg de β_2 dans 0,750 ml de $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{100}$ β - ME , $\frac{M}{100}$ L-Sérine et 5 μ g/ml de PLP.

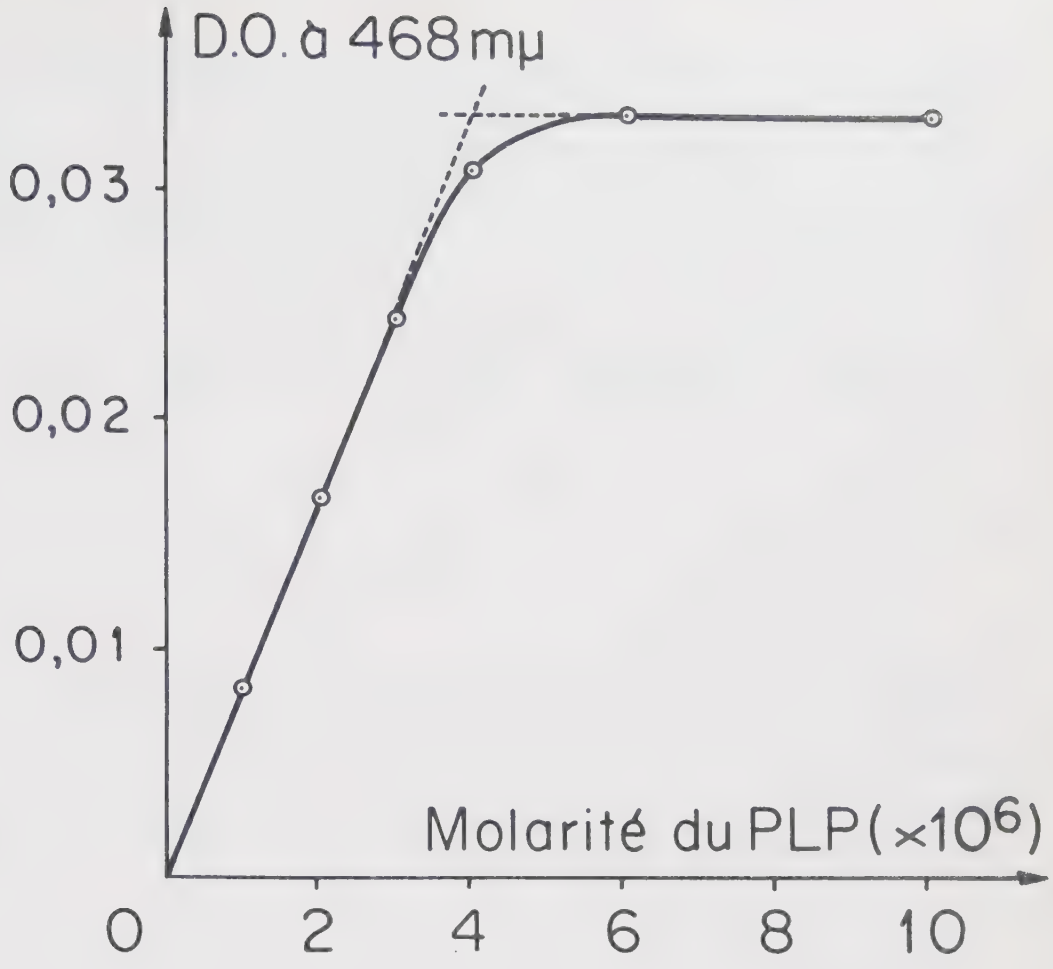


Fig. 13 - Saturation de $\alpha_2 \beta_2$ avec le PLP

La concentration de chaine α est $3,9 \cdot 10^{-6}$ M .

La chaine α est en excès.

Le tampon initial est $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8) , $\frac{M}{100}$ β - ME , $\frac{M}{100}$ L-Sérine.

En abscisses est portée la molarité du PLP (libre + lié) dans la solution de $\alpha_2 \beta_2$.

Affinité apparente du complexe $\alpha_2 \beta_2$ pour la L-sérine.

La concentration de L-sérine requise pour donner une densité optique à 468 mμ égale à la moitié de la densité optique à saturation de sérine, soit K', a été déterminée en ajoutant des quantités croissantes de L-sérine à un mélange contenant α, β_2, PLP et β - ME. Pour chaque valeur de la concentration de L-sérine, la densité optique à 468 mμ a été mesurée. La valeur trouvée pour K' est :

$$K' = 3.10^{-4} M.$$

Cette valeur est en bon accord avec celle trouvée ci-dessous pour la concentration minimum de L-sérine nécessaire à une association complète entre α et β_2 en gradient de sucrose.

Affinité apparente du complexe $\alpha_2 \beta_2$ pour le β - ME :

De même, la concentration de β - ME requise pour obtenir une densité optique à 468 mμ égale à la moitié de la densité optique à saturation de β - ME, soit K", a été mesurée de la même manière (cf. figure 14). La valeur élevée obtenue :

$$K'' = 1,33 . 10^{-2} M$$

confirme l'idée que le β - ME n'est pas un ligand naturel de $\alpha_2 \beta_2$.

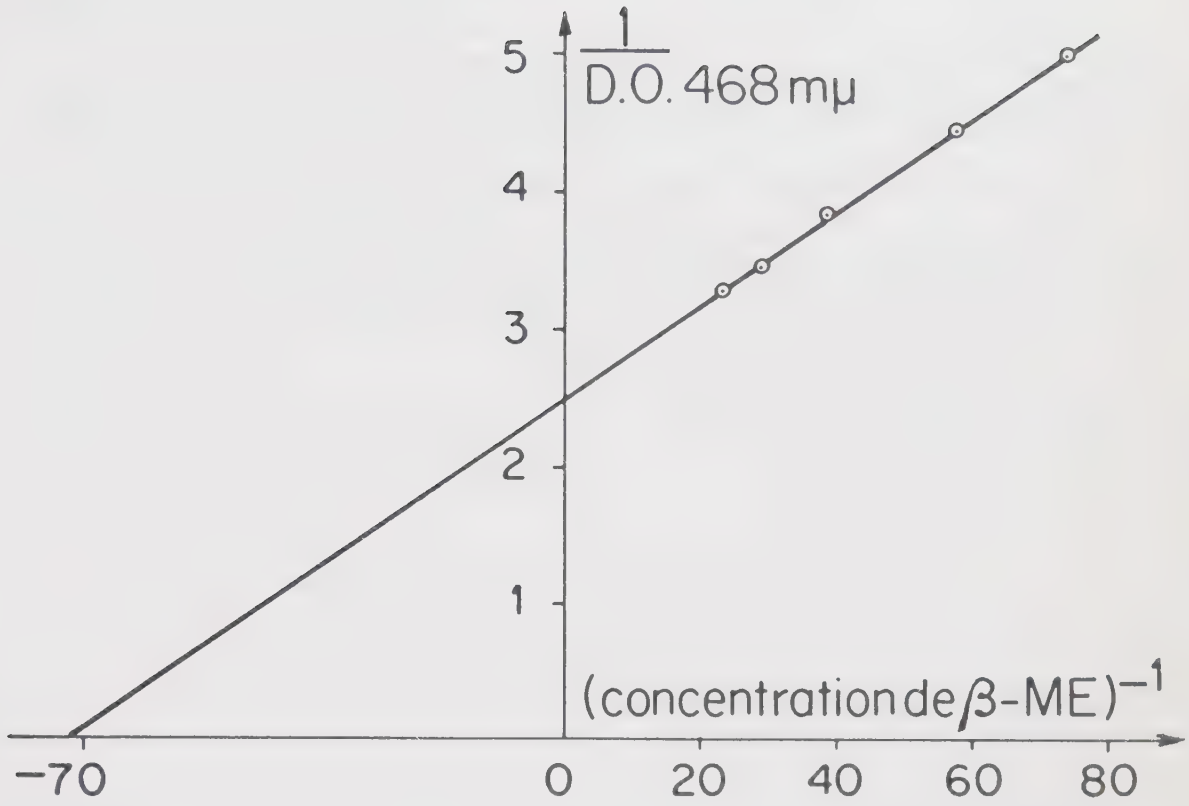


Fig. 14 - Détermination de la constante d'association apparente entre α_2 β_2 et le β - ME

La concentration de β_2 est 1,35 mg/ml. α est en excès. Le tampon initial est $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium (pH 7,8), $\frac{M}{10}$ L-Sérine et 5 μ g/ml de PLP.

En ordonnées est porté l'inverse de la densité optique à 468 m μ, et en abscisses l'inverse de la concentration de β- ME.

Influence du pH sur le complexe ambré :

La variation de l'absorption à 468 mμ en fonction du pH de la solution a été étudiée de la manière suivante ; dans chaque expérience, un même volume de tampon phosphate de potassium a été ajouté à un volume constant de solution de α et β_2, de telle sorte que le pH final et la force ionique finale de la solution aient les valeurs désirées. Les concentrations de PLP et de β ME étaient respectivement 5 μg/ml et 10^{-1} M. La concentration de L-Sérine était 10^{-3} M. Le résultat de ces expériences est montré sur la figure 15 où la densité optique à 468 mμ est portée en fonction du pH de la solution.

Si l'activité enzymatique de $\alpha_2 \beta_2$ dans la réaction :

Indol + L-Sérine → L-Tryptophane

est mesurée à une concentration de L-Sérine égale à 10^{-3} M, et à différents pH, la dépendance de l'activité vis-à-vis du pH (voir fig. 15) se comporte d'une manière très analogue à celle de la densité optique à 468 mμ . Dans la même région de variation du pH, l'activité ne varie pratiquement pas avec le pH si la mesure est faite avec de la L-Sérine $\frac{M}{10}$. On en conclut que les variations observées à faible concentration de sérine sont dues à des variations de l'affinité de $\alpha_2 \beta_2$ pour la sérine avec le pH.

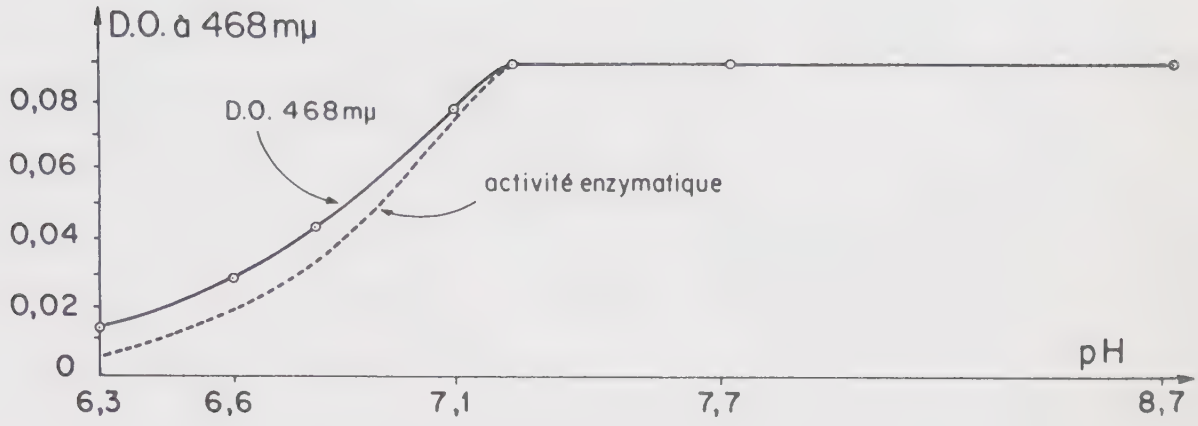


Fig. 15 - Influence de pH sur le complexe ambré

La concentration de β_2 est 0,5 mg/ml. α est en excès. Le tampon est $\frac{M}{10}$ phosphate de potassium, $\frac{M}{100}$ β - ME, $\frac{M}{1000}$ L-Sérine et 5 μg/ml de PLP

en traits pleins : densité optique à 468 mμ

en pointillés : activité enzymatique en unités arbitraires.

4°) Influence du β- ME sur l'activité enzymatique de $\alpha_2 \beta_2$.

La nécessité de la présence du β ME pour l'apparition de la bande à 468 mμ pose le problème du rôle éventuel du β ME dans l'activité de l'enzyme.

L'effet du β- ME sur l'activité enzymatique du complexe $\alpha_2 \beta_2$ a donc été étudié pour les réactions suivantes :

$$\begin{cases} \text{Indol} + \text{L-Sérine} \rightarrow \text{L-Tryptophane} \\ \text{L-Sérine} \rightarrow \text{Pyruvate} + NH_3 \end{cases}$$

Une solution de sous-unités β_2 saturées de chaines α a été le tampon suivant : Tris-HCL 0,05 M (pH 7,8) et PLP à 5 μ g/ml.

L'activité de cette solution a été mesurée en présence et en l'absence de β - ME $\frac{M}{10}$. Aucun changement d'activité n'a pu être observé dans les deux réactions ci-dessus.

Le β - ME n'intervient donc aucunement dans les réactions enzymatiques ci-dessus. L'explication du rôle du β - ME sera donnée plus loin (§ 7).

Nous pouvons en conclure que le complexe $\alpha_2 \beta_2$ et le complexe ambré se comportent de manière identique en ce qui concerne l'activité enzymatique.

5°) Caractérisations du complexe ambré.

Le chromophore responsable de l'absorption à 468 mμ pouvait être a priori ou bien libéré en solution, ou bien lié à l'enzyme. S'il était lié à l'enzyme, il fallait déterminer la structure de cette forme de l'enzyme.

Ce problème a été étudié par centrifugation analytique, en utilisant simultanément deux systèmes optiques : l'optique Schlieren et le système d'absorption de la lumière à 468 mμ (voir le chapitre I).

La centrifugation a été effectuée en tampon phosphate $\frac{M}{100}$ (pH 7,8), β - ME $\frac{M}{100}$, PLP à 5 μ g/ml, et L-Sérine $\frac{M}{100}$. Les protéines centrifugées étaient un mélange stoechiométrique de α et β_2 (4 mg/ml). Les coefficients de sédimentation mesurés étaient 6,75 S pour la protéine (optique Schlieren) et 6,78 S pour le chromophore absorbant à 468 mμ (système d'absorption).

Aucune étude de la variation de ces coefficients de sédimentation en fonction de la concentration de protéine n'a été entreprise, mais les valeurs ont été corrigées des effets de viscosité, température, et densité du solvant. La valeur corrigée :

$$S_{w,20} = 6,35 \text{ S}$$

est en excellent accord avec la valeur 6,4 S pour le complexe $\alpha_2 \beta_2$.

La conclusion de cette expérience est que le chromophore qui absorbe à 468 m μ est physiquement associé au complexe $\alpha_2 \beta_2$.

Pour démontrer que le complexe ambré correspond bien à une association forte entre les chaines α et β même aux faibles concentrations de protéines utilisées dans les centrifugations en gradient de sucrose, trois expériences ont été faites : un mélange de sous-unités α et β_2 (α en excès) a été superposé à 3 gradients de sucrose préformés dans le tampon suivant : Tris-citrate 0,05 M (pH 7,8),5 μ g/ml PLP, β- ME $\frac{M}{100}$ et L-Sérine. Dans les trois gradients, les concentrations respectives de sérine étaient : 5.10^{-5} M, 5.10^{-4} M et 10^{-3} M. Après centrifugation le coefficient de sédimentation de l'activité β_2 a été mesuré. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus.

TABLEAU III

Concentration de Sérine dans le gradient	$S_{20,w}$
5.10^{-5} M	5,6 S
5.10^{-4} M	6,3 S
10^{-3} M	6,4 S

Ces résultats sont en bon accord avec la valeur de K ' (constante d'association apparente de la sérine) trouvée ci-dessus, et montrent que le complexe ambré est effectivement l'une des formes fortement associées des sous-unités.

6°) Position sur l'enzyme du site responsable de la bande à 468 mμ .

On peut se poser la question de savoir si l'apparition de la bande à 468 mμ est caractéristique d'un site nouveau créé par la juxtaposition des chaines α et β ou d'un site inhérent à l'une des chaines, activé par la présence de l'autre chaine.

Hatanaka, White, Oribata et Crawford (1962) ont montré qu'en présence de concentrations élevées d'ions ammonium,(2 à 3 M),les sous-unités β_2 peuvent être activées jusqu'à 60 % de leur activité maximum (i.e. lorsqu'elles sont saturées de α). En présence de ces hautes concentrations d'ions ammonium, de L-Sérine $\frac{M}{10}$, de β- ME $\frac{M}{100}$ et de PLP à 5 μ g/ml, mais en l'absence de chaînes α , une solution de sous-unités β_2 donne naissance à la bande à 468 mμ.

Ceci suggère que le site où se forme le chromophore est inhérent à β_2 , mais doit être modifié soit par la présence de α soit par celle d'ions ammonium concentrés.

Là encore, un parallèle frappant existe entre l'apparition de la bande à 468 mμ et l'activité enzymatique spécifique de β_2 .

7°) Signification probable du complexe ambré.

Le parallèle entre la présence de la bande à 468 mμ et l'activité spécifique des sous-unités β_2 introduit l'hypothèse que le complexe ambré est un

intermédiaire naturel dans la réaction de synthèse du tryptophane. Le fait que le β - ME soit requis pour l'apparition de la bande et ne le soit pas pour l'activité enzymatique conduit à douter de cette hypothèse. Pourtant, les expériences suivantes suggèrent très fortement que le complexe ambré est bien un intermédiaire. Le rôle du β- ME serait alors d'augmenter la concentration en régime stationnaire de cet intermédiuire.

a) Le spectre d'absorption d'une solution contenant le complexe $\alpha_2 \beta_2$, de la L-Sérine $\frac{M}{10}$, de l'indol 10^{-2} M, 5 µ g/ml de PLP, et une concentration nulle de β- ME, a été rapidement enregistré : moins d'une minute et demie s'est écoulée entre le mélange de l'enzyme avec ses substrats et la fin de l'enregistrement. Tout au long de l'expérience, les concentrations de substrats sont restées très largement supérieures aux constantes de Michaelis respectives ; les concentrations en régime stationnaire des intermédiaires n'ont donc que très peu varié. Le spectre est reproduit dans la figure 16. Dans des conditions où seuls les substrats physiologiques sont fournis à l'enzyme on peut voir en plus de la large bande centrée à 415 mµ (caractéristique de l'enzyme libre) un épaulement aigu, centré à 472 mµ , que l'on peut interpréter comme étant dû au même chromophore que celui du complexe ambré ; la légère différence de longueur d'onde au centre de la bande pourrait être due au fait que l'indol lié à la protéine peut modifier notablement la polarité de l'environnement du chromophore.

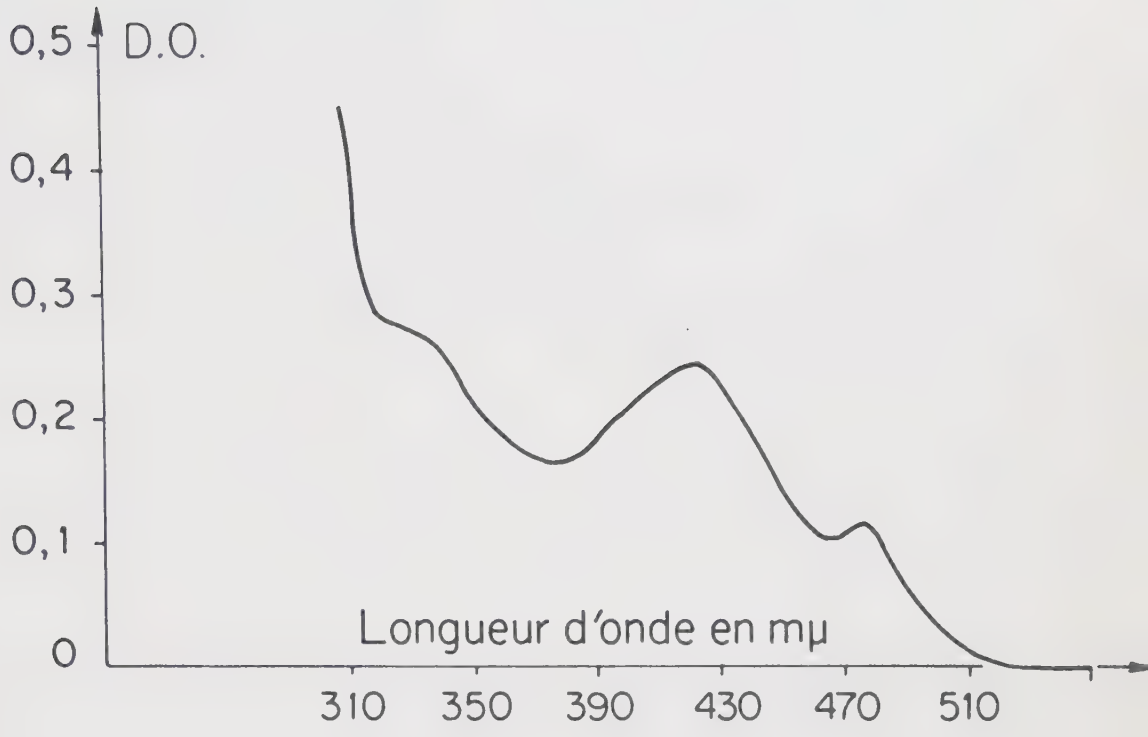


Fig. 16 - Spectre du complexe $\alpha_2 \beta_2$ pendant la réaction n° 2

La concentration de β_2 est 4,35 mg/ml. α est en excès. Le tampon est 0,05 M Tris-HCL (pH 7,8), 5 μ g/ml PLP, $\frac{M}{10}$ L-Sérine et $\frac{M}{100}$ Indol.

b) Lorsqu'on mélange les composants requis pour donner naissance au complexe ambré, (α, β_2 , PLP à 5 µ g/ml , $\frac{M}{100}$ Sérine, $\frac{M}{10}$ β - ME) et qu'on observe la densité optique à 468 m µ , on remarque que celle-ci diminue pour finalement disparaitre et redonner le spectre classique du complexe α_2 β_2 (fig. 11). Si alors on rajoute de la sérine on constate que la bande à 468 mµ est régénérée. La L-Sérine est donc transformée au cours d'une réaction chimique. Pour étudier le sort de la sérine, l'expérience suivante a été faite : un mélange contenant α, β_2 , PLP à 5 µ g/ml , L-Sérine $\frac{M}{100}$ et β- ME $\frac{M}{10}$ est préparé, et incubé à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 468 mµ soit redevenue nulle. Un aliquot de cette solution est alors placé sur un analyseur d'acides aminés. Après élution, on constate qu'il ne restait plus dans la solution qu'une concentration négligeable de Sérine, et qu'un nouvel amino-acide, élué 5 minutes avant la Sérine, est détecté. La quantité de cet amino-acide est celle prévue sur la base d'une conversion stoechiométrique de la Sérine.

Le fait que le β- ME soit requis pour donner cette réaction nous a suggéré que le nouvel acide aminé pourrait être la 2-hydroxyéthyl-S-cystéine :

$$HO-CH_2 - CH_2 - S - CH_2 - \underset{\displaystyle N H_2}{\underset{|}{CH}} - COOH$$

Ce dernier acide aminé a été synthétisé et cristallisé, conformément au procédé décrit par Verderame (1961). Cet acide aminé, étudié sur l'analyseur d'acides aminés, est élué exactement au même endroit que le produit de l'action

de α_2 β_2 sur la Sérine et le β - ME. On en conclut que la tryptophane-synthétase de Coli catalyse* la réaction suivante :

$$\text{L-Sérine} + \beta\text{- ME} \rightarrow \text{L-2-Hydroxyéthyl-S-cystéine} + H_2O$$

Ce résultat suggère que le complexe ambré est un intermédiaire naturel dans la synthèse de ce nouvel acide aminé, donc que c'est bien un complexe actif.

En répétant ce genre d'expérience, on peut montrer que si l'on remplace le β- ME par de l'hydrogène sulfuré (H_2S), le complexe α_2 β_2 catalyse la réaction :

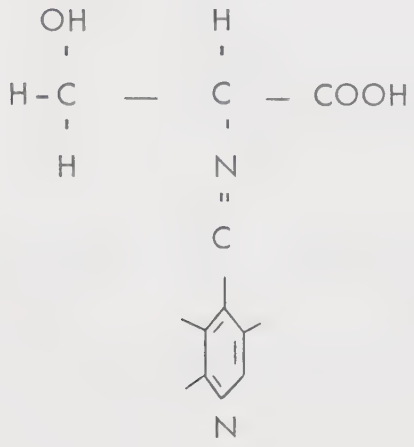
$$\text{L-Sérine} + H_2S \rightarrow \text{L-Cystéine} + H_2O$$

On a pu montrer également que ces deux réactions sont réversibles, et que la sous-unité β , en l'absence de α , ne peut pas les catalyser.

(*) Une expérience témoin a été effectuée dans laquelle l'enzyme n'a pas été ajouté au mélange de PLP, Sérine et β - ME. Aucune trace de 2-hydroxyéthyl-S-cystéine n'a pu être mise en évidence après incubation.

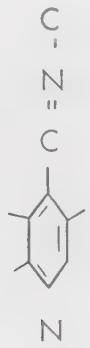
8°) Structure probable du chromophore qui absorbe à 468 mμ .

Une base de Schiff entre le PLP et la Sérine peut être représentée par la structure suivante :



Une telle base de Schiff présente un maximum d'absorption aux environs de 420 mμ . L'introduction d'une double liaison supplémentaire, conjugée avec le système de résonance de la base de Schiff, doit augmenter la longueur d'onde du maximum d'absorption du chromophore. Cette augmentation doit être de l'ordre de 50 mμ , portant le maximum à environ 470 mμ ; c'est-à-dire à une valeur suffisamment voisine de 468 mμ pour qu'un tel modèle puisse servir d'hypothèse de travail.

Le mécanisme le plus simple par lequel une double liaison conjugée peut être introduite dans la base de Schiff ci-dessus est l'élimination interne d'une molécule d'eau entre les carbones α et β de la sérine pour donner alors une base de Schiff entre le PLP et l'acide α- aminoacrylique.



Il est impossible d'étudier le spectre d'absorption de cette molécule libre en solution pour le comparer à celui du complexe ambré. En effet, cette base de Schiff est extrêmement instable et son hydrolyse en pyruvate, ammonium et PLP doit être immédiate.

Cette propriété suggère que la base de Schiff entre le PLP et l'acide α-aminoacrylique peut bien être un intermédiaire dans la déamination de la sérine par β_2 puisqu'on trouve les mêmes substrats et les mêmes produits.

D'autre part, il est difficile d'imaginer un mécanisme chimique ne faisant pas appel à cet intermédiaire pour la synthèse de 2-hydroxyéthyl-S-cystéine (ou de cystéine) à partir de sérine et de β - ME (ou d'hydrogène sulfuré). Dans cette hypothèse, l'attaque nucléophile par le β- ME (ou la cystéine) de la double liaison $C_\beta = C_\alpha$ fournirait l'acide aminé, produit de la réaction.

D'une manière analogue, l'attaque nucléophile de cette double liaison par le carbone n° 3 de l'indole (qui est effectivement l'atome le plus nucléophile du noyau indole) fournirait à son tour le tryptophane.

Tatum et Shemin, dès 1954, ont proposé ce modèle de réaction pour la synthèse du tryptophane. Leur argument principal était l'échange du proton du carbone α de la sérine pendant la synthèse du tryptophane. Leur expérience était faite avec un extrait non purifié de Neurospora Crassa. Nous avons vérifié qu'une préparation pure de tryptophane-synthétase de E. Coli incorpore un atome de tritium par molécule de tryptophane formée quand la réaction a lieu dans de l'eau tritiée.

A cet effet, 1 ml d'une solution de complexe $\alpha_2 \beta_2$ (10^{-5} M) a été incubé à 37° pendant 90 minutes. Le solvant contenait du phosphate de potassium $\frac{M}{10}$ (pH 7,8), 5 µ g/ml de PLP, de la L-Sérine $\frac{M}{100}$, de l'indole $\frac{M}{100}$ et de l'eau tritiée (6.10^7 désintégrations par minute par ml). Après 90 minutes, les substrats étaient entièrement transformés en tryptophane. L'enzyme a alors été inactivé en diminuant le pH de la solution jusqu'à pH 4 par addition d'acide formique. La solution a alors été séchée sous vide ; le résidu a été resuspendu dans 5 ml d'eau distillée non radioactive et séchée à nouveau sous vide, dans le but d'éliminer les atomes de tritium librement échangeables. Ce lavage a été répété trois fois. Le dernier résidu a été dissout dans 2 ml d'eau distillée et sa radioactivité a été déterminée dans un liquide à scintillation qui accepte des solutions aqueuses

(Bray, 1960). Dans ces conditions, 10 800 cpm ont été incorporés dans le tryptophane. On peut donc conclure qu'un atome d'hydrogène est échangé pendant la condensation de la sérine et de l'indole. Cette condensation se fait donc par déshydratation interne.

Ce résultat appuie l'hypothèse que la base de Schiff entre le PLP et l'acide α - aminoacrylique est un véritable intermédiaire dans la synthèse du tryptophane.

CHAPITRE VI

MECANISME PROPOSE DE L'ACTION DE LA TRYPTOPHANE-SYNTHETASE

Au cours du chapitre précédent, quatre types de spectres d'absorption ont été identifiés. Ils correspondent à quatre types de structures dans lesquelles le PLP est engagé. Les caractéristiques optiques de ces spectres sont rappelées dans le tableau ci-dessous :

Type spectral	Absorption	Emission
I	415 mμ	508 mμ (faible)
II	424 mμ	500 mμ (forte)
III	468 mμ	aucune
IV	étalée entre 300 et 450 mμ	aucune

L'interprétation de ces spectres a déjà été donnée. Pour plus de clarté, il semble néanmoins opportun de la rappeler ici :

Spectre de type I : il peut être attribué à une base de Schiff formée entre la fonction aldéhyde du PLP et une fonction amine (probablement ε- amine d'une lysine) de l'enzyme : soit β_2 , soit α_2 β_2 , soit encore le "complexe de rencontre" entre l'une de ces deux protéines et la sérine. Le terme "complexe de rencontre" est utilisé ici pour désigner les molécules de protéine dont le site spécifique de liaison de la sérine est occupé par une molécule de sérine sans que celle-ci ait encore subi de modification de sa structure.

Spectre de type II : il peut être attribué à une base de Schiff entre le PLP et la sérine, cette base de Schiff étant en interaction forte avec la protéine. Le maximum d'absorption à 424 mμ est en accord avec cette hypothèse. Bien qu'une base de Schiff, libre en solution, entre le PLP et la sérine ne soit pas fluorescente, il est très vraisemblable qu'elle le devienne lorsque le chromophore est fortement lié à la protéine ; ce genre de modification des propriétés de fluorescence est fréquemment rapporté. Weber et Laurence (1954), Winkler (1962) , Gally et Edelman (1965).

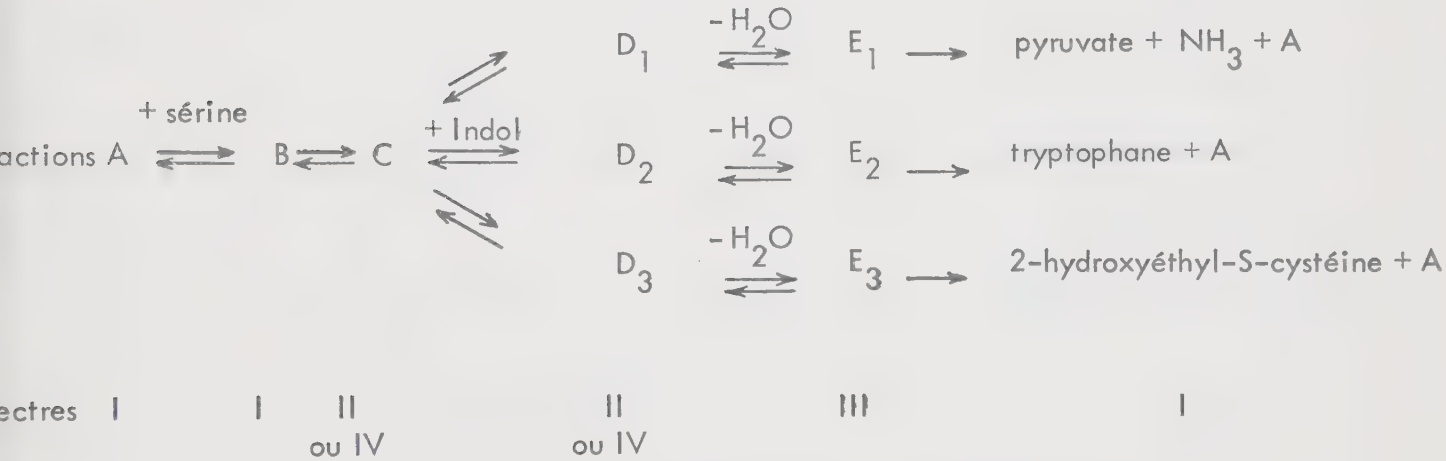
Spectre de type III : il a déjà été attribué à la base de Schiff entre le PLP et l'acide α - aminoacrylique, liée à l'enzyme β_2 . C'est ce que nous avons appelé "complexe ambré" lorsque la chaine α et le β- ME sont présents.

Spectre de type IV : ce spectre a des caractéristiques trop peu définies pour qu'on puisse l'attribuer à une structure particulière. L'absence de bande d'absorption précise peut-être due soit à un équilibre entre plusieurs états du PLP

absorbant chacun à différentes longeurs d'ondes, soit à un seul état du PLP dont le spectre d'absorption serait très étalé entre 350 et 450 m μ .

Ce type de spectre sera tout de même appelé "caractéristique" du complexe fortement associé $\alpha_2\ \beta_2$ obtenu en présence de L-Sérine et de PLP (Creighton et Yanofsky, 1966).

Ces quatre espèces de spectres correspondent donc à quatre types de structures que l'on peut attribuer à quatre états de la sous-unité β_2 au cours de son action catalytique. Il est aisé d'ordonner ces différentes formes en une séquence de réactions qui représente le phénomène d'activation de la sérine par le PLP et l'enzyme :



ectres I I II ou IV II ou IV III I

- A est l'enzyme libre (β_2 ou $\alpha_2\ \beta_2$) saturé de PLP
- B est le "complexe de rencontre" entre l'enzyme (β_2 ou $\alpha_2\ \beta_2$) et la L-Sérine. Le PLP est encore en base de Schiff avec l'enzyme.

- C est soit la base de Schiff, entre le PLP et la L-Sérine, liée à l'enzyme si β_2 est seul (spectre de type II), soit le complexe fortement associé $\alpha_2\beta_2$ (spectre de type IV).

- D est le "complexe de rencontre" entre C et H_2O (D_1), Indol (D_2) ou β-ME (D_3). Le PLP est toujours en base de Schiff avec la sérine.

- E est la base de Schiff, liée à l'enzyme entre le PLP et l'acide α-amino acrylique. C'est le complexe "enzyme-substrats" de Michaelis.

Le spectre d'une solution de β_2 en présence d'une concentration élevée de L-Sérine ($\frac{M}{10}$) est principalement du type I en ce qui concerne l'absorption : en effet, on ne peut le distinguer du véritable spectre I (β_2 sans L-Sérine) que par un très léger déplacement du maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'onde, de l'ordre de 3 mμ. On peut en conclure que, à concentration saturante de L-Sérine, la protéine β_2 est principalement sous la forme du "complexe de rencontre" avec la L-Sérine. Seule une faible proportion de β_2 est sous la forme fluorescente (le maximum d'absorption serait à 424 mμ) et aucune absorption à 468 mμ n'est détectable.

En présence de chaine α, et en l'absence de tout autre substrat que la L-Sérine, ceci n'est plus vrai : un "complexe de rencontre" est, par définition, en équilibre librement réversible avec le substrat et l'enzyme libre. Nous avons montré (voir chapitre III) que la L-Sérine reste irréversiblement fixée à $\alpha_2\beta_2$

en l'absence d'autre substrat. On peut donc penser que l'un des effets de la combinaison entre α et β_2 est d'augmenter l'efficacité de la rencontre entre l'enzyme et la L-Sérine.

Une fois constitué le complexe entre l'enzyme et la sérine, il y a déshydratation interne et formation de la base de Schiff entre le PLP et l'acide α - aminoacrylique. Dans le cas où la sous-unité β_2 est seule, cette déshydratation interne est probablement spontanée et le deuxième substrat (H_2O ou Indol) peut agir sur le radical séryl activé ; le β - ME ne donne pas de composé d'addition car il y a compétition entre le β - ME ($\frac{M}{10}$) et l'eau (55 M). Dans le cas où β_2 est saturé de chaine α, la présence de β- ME ou d'indol augmente considérablement la vitesse de formation de la base de Schiff entre le PLP et l'acide α - aminoacrylique, augmentant ainsi la concentration en régime stationnaire de cette base de Schiff ; c'est la raison pour laquelle l'absorption à 470 m μ est accrue en présence de β - ME ou d'indol. La double liaison entre les carbones C_α et C_β de l'acide α - aminoacrylique est alors prête à être attaquée par le groupe nucléophile soit du β- ME (- SH) soit de l'indol (carbone 3) pour donner soit la 2 - hydroxyéthyl - S - cystéine, soit le tryptophane.

Il faut remarquer que, malgré la grande concentration de la base de Schiff entre PLP et acide α - aminoacrylique en présence de β - ME et la faible activité du complexe ambré dans la synthèse de 2 - hydroxyéthyl - S - cystéine il n'y a pas de déamination de la sérine ; donc pas de compétition entre l'eau et le β- ME au niveau de la "sérine activée".

Pour expliquer cela, on peut faire l'hypothèse que le complexe stable entre α_2 β_2, le PLP et la L-Sérine est fait de telle sorte que la sérine soit enfermée dans une région très hydrophobe que l'eau ne peut atteindre. Cette région hydrophobe aurait pour effet d'empêcher l'attaque par l'eau du complexe E* , donc de le stabiliser considérablement, afin de permettre à l'indol d'attaquer la double liaison entre les carbones C_α et C_β de l'acide α-aminoacrylique pour donner le tryptophane. Outre cette interprétation de l'effet de la chaine α sur l'activité de β_2, l'hypothèse de l'existence de la région hydrophobe autour du site catalytique fournit une explication de l'irréversibilité de l'association entre α_2 β_2 le PLP et la L-Sérine : le transfert de la fonction aldéhyde du PLP d'un groupe aminé à un autre peut se faire soit par une hydrolyse de la base de Schiff existante suivie d'une élimination d'eau entre l'autre amine et le PLP, soit par la formation d'une carbinolimine intermédiaire qui exige un milieu polaire. L'effet de la région hydrophobe autour de la sérine serait alors d'inhiber le transfert du PLP de la sérine à la protéine, empêchant ainsi la libération de la sérine.

Cette hypothèse, il faut en convenir, est bien fragile et ardue à vérifier. Elle fournit cependant une explication simple à la fois pour le rôle de la chaine α dans l'activation de la sous-unité β_2, et pour l'irréversibilité de l'association entre α_2 β_2, le PLP et la L-Sérine.

(*) l'extrême instabilité de la base de Schiff entre le PLP et l'acide -amino-acrylique en milieu polaire a déjà été mentionnée plus haut.

APPENDICE

Interprétation des affinités apparentes entre la sérine et la sous-unité β_2

Nous avons mentionné (cf. page 45) le fait que la constante de Michaelis K_m pour la sérine dans la réaction

$$\text{L-Sérine} \rightarrow \text{pyruvate} + NH_3 + H_2O$$

est catalysée par β_2 est $1{,}45 \cdot 10^{-2}$ M.

De même pour la réaction L-Sérine + Indol → L-Tryptophane , $K_m = 2 \cdot 10^{-2}$ M (Hatanaka et al. 1962).

La constante de dissociation apparente K (égale à la concentration de sérine pour laquelle la fluorescence du composé C est la moitié de la fluorescence à saturation de sérine) est $K = 1{,}1 \cdot 10^{-3}$ M. De même, K' (égale à la concentration de sérine pour laquelle la densité optique à 468 mμ est la moitié de la densité optique à saturation de sérine) est $K' = 3 \cdot 10^{-4}$ M.

Comment expliquer la grande différence entre K_m d'une part et K et K' d'autre part ?

Si l'on écrit une séquence de réactions partielles simplifiée :

$$\text{Enzyme} + \text{Sérine} \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} \text{Enzyme} - \text{Sérine} + \text{Indol} \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}}$$

$$\text{Enzyme} - \text{Sérine} - \text{Indol} \xrightarrow{k_{34}} \text{Enzyme} + \text{Tryptophane}$$

un traitement classique des équations cinétiques en régime stationnaire aboutit à l'expression suivante de la vitesse de réaction :

$$v = \frac{V_{max}\, SI}{SI + \alpha S + \beta I + \gamma}$$

où S est la concentration de sérine

I est la concentration d'indol

$$\alpha = \frac{k_{32} + k_{34}}{k_{23}} \qquad \beta = \frac{k_{34}}{k_{12}} \qquad \gamma = \frac{k_{21}\,(k_{32} + k_{34})}{k_{12} \cdot k_{23}}$$

Alors la concentration K_m dé sérine telle que la vitesse de réaction soit la moitié de la vitesse maximum satisfait la relation :

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}\, K_m\, I}{K_m I + \alpha K_m + \beta I + \gamma}$$

D'où

$$\boxed{K_m = \frac{I - \gamma}{I - \alpha}}$$

Si la concentration d'indol est très élevée, K_m tend vers β , soit vers $\frac{k_{34}}{k_{12}}$.

Or, la constante de dissociation entre la sérine et l'enzyme est $\frac{k_{21}}{k_{12}}$.

D'autre part, k_{34} est très supérieur à k_{21} puisqu'on ne voit pas s'accumuler l'intermédiaire "Enzyme - sérine" . Donc K_m (soit $\frac{k_{34}}{k_{12}}$) est très supérieur à l'inverse de l'affinité (soit $\frac{k_{21}}{k_{12}}$).

Il est vraisemblable que les valeurs K et K' sont plus proches de K_m de la constante de dissociation réelle ; donc il est normal que K_m soit très supérieur à K et K' .

D'autre part, il est difficile d'interpréter la différence entre K et K' , puisqu'aucune de ces deux valeurs n'est une mesure exacte de l'affinité de la sérine pour β_2 ou $\alpha_2 \beta_2$. Toutefois, le fait que K' soit inférieur à K est en bon accord avec une diminution des constantes de Michaelis pour l'indol et le PLP au cours de l'association entre α et β_2 (Hatanaka et al. 1962).

CONCLUSION

L'étude par centrifugation analytique de la structure quaternaire de la tryptophane-synthétase de E. Coli a abouti à la conclusion que cet enzyme est un dimère ; le protomère est constitué par une chaine peptidique α et une chaine peptidique β. Le complexe complet peut être représenté par la formule $\alpha_2 \beta_2$.

Cette structure est compatible avec l'existence d'un axe de symétrie dans la molécule, ce qui augmente * la vraisemblance de l'hypothèse de Monod, Wyman et Changeux (1965) selon laquelle les agrégats protéiques doivent en général posséder des axes de symétrie.

Les masses moléculaires du dimère β_2 et du complexe $\alpha_2 \beta_2$ ont été mesurées par la méthode d'Archibald appliquée dans les conditions de La Bar. Les valeurs trouvées sont 99 000 pour β_2 et 159 000 pour $\alpha_2 \beta_2$.

La nature du complexe irréversiblement associé entre α, β_2, le PLP et la L-Sérine a été étudiée ; ce complexe contient une molécule de sérine par protomère. Cette molécule est associée au site actif par un type de liaison qui n'est pas intrinsèquement irréversible : la sérine est en effet libérée lorsqu'on dénature le complexe par l'urée. L'irréversibilité de la liaison a été attribuée à

(*) A l'époque où notre étude a été entreprise, la tryptophane-synthétase de E. Coli était réputée avoir la structure $\alpha \beta_2$, incompatible avec l'existence d'un axe de symétrie.

la formation d'une région très hydrophobe autour du site actif lors de l'établissement du complexe stable $\alpha_2\ \beta_2\ (PLP)_2\ (sérine)_2$; cette propriété n'a pu être démontrée directement mais elle parait très vraisemblable à la lumière des résultats obtenus au cours de ce travail sur le mécanisme d'action de l'enzyme.

L'étude des propriétés optiques des sous-unités de la tryptophane-synthétase avait pour but initial de découvrir un changement de l'absorption, de la fluorescence ou du pouvoir rotatoire de ces protéines qui soit caractéristique de l'association :

$$2\ \alpha + \beta_2 \rightarrow \alpha_2\ \beta_2$$

Bien que ce but n'ait pu être atteint, il nous a été possible de comprendre quelques aspects du mécanisme enzymatique de la sous-unité β_2, soit seule, soit engagée dans le complexe $\alpha_2\ \beta_2$: les propriétés de fluorescence et d'absorption du PLP lié à β_2 ont en effet conduit à l'identification de deux intermédiaires liés à la sous-unité β_2, dans la réaction :

$$\text{Indol} + \text{L-Sérine} \rightarrow \text{L-Tryptophane}$$

L'un est fluorescent ($\lambda_{\text{max excitation}} = 424\ m\mu$ et $\lambda_{\text{max émission}} = 500\ m\mu$). L'autre ne l'est pas mais il absorbe fortement la lumière aux environs de 470 m μ. Nous avons émis l'hypothèse que ces propriétés optiques correspondent

respectivement aux bases de Schiff entre le PLP et la sérine et entre le PLP et l'acide α - aminoacrylique. Sans qu'il ait pu être possible de démontrer rigoureusement cette hypothèse, plusieurs arguments qui la soutiennent ont été présentés.

L'identification de ces intermédiaires a finalement permis d'établir une séquence d'étapes élémentaires qui conduisent à l'activation de la sérine par la sous-unité β_2.

Il est intéressant de comparer la tryptophane - synthétase de E. Coli à l'hémoglobine humaine dont la structure est également α_2 β_2 : cette protéine, l'une des mieux étudiées, possède bien les axes de symétrie prévus par l'hypothèse de Monod, Wyman et Changeux. Toutefois, les propriétés de dissociation en sous-unités de ces deux protéines diffèrent considérablement : l'hémoglobine humaine peut être dissociée, avec quelque difficulté, en monomères α et en tétramères β_4 stables (Huehns, Dance, Shooter et Beaven, 1962 ; Bucci et al. 1965). Une dissociation symétrique en α β a également été observée par Guidotti, Koenigsberg et Craig (1963). Mais aucun trimère α β_2 n'a jamais été trouvé. Dans le cas de la tryptophane - synthétase de E. Coli, seule la dissociation asymétrique en α et β_2 a pu être observée. L'observation que le trimère α β_2 est stable (Goldberg et al., 1966) suggère que la chaine α peut s'ajouter au dimère β_2 préexistant sans altérer sa structure et indique que la stabilité du complexe incomplet α β_2 n'est pas très différente de celle du complexe α_2 β_2.

Il est aussi intéressant de comparer les tryptophane-synthétases de E. Coli et de Neurospora Crassa (Carsiotis, Appella, Prorost, Germershausen et Suskind, 1965). Ce dernier enzyme est également constitué de quatre chaines peptidiques ; deux d'un type et deux d'un autre. Sa masse moléculaire est de l'ordre de 135 000 à 150 000. La composition en sous-unités et la taille de ces deux tryptophane-synthétases suggèrent qu'elles ont une origine évolutive commune.

L'élucidation du mécanisme d'action de la sous-unité β_2 et la découverte de nouvelles réactions faiblement catalysées par cette protéine servent de base aux spéculations suivantes sur l'évolution possible d'une protéine.

La tryptophane-synthétase de E. Coli peut catalyser les réactions :

(2 bis) L-Sérine $\rightleftarrows$ pyruvate + NH_3 + H_2O

et (4) L-Sérine + H_2S $\rightleftarrows$ L-Cystéine + H_2O

en présence de PLP.

Ces deux réactions sont catalysées par cet enzyme à des taux extrêmement faibles, bien qu'elles comportent un certain nombre d'intermédiaires communs avec la réaction la plus efficacement catalysée par l'enzyme :

(2) Indol + L-Sérine $\rightarrow$ L-Tryptophane

Le fait que la partie commune des séquences de réactions qui conduisent à la synthèse du pyruvate, de la cystéine ou du tryptophane, soit celle qui conduit à l'activation de la L-Sérine permet d'attribuer au "site catalytique" de l'enzyme deux fonctions distinctes : l'une est d'activer la sérine, l'autre est de fixer le second substrat (H_2O , H_2S , Indol ...) dans la position la plus favorable à son action sur la sérine activée. Il est alors très vraisemblable qu'à partir d'une protéine possédant le site d'activation de la L-Sérine l'évolution ait sélectionné les mutants ayant le site d'affinité pour le second substrat ; ainsi, la L-cystéine déhydrase (Smythe, 1942) que l'on trouve dans les tissus animaux, la levure et les bactéries (Binkley, 1943 ; Kallio, 1951 ; Metaxas et Delwiche, 1955) pourrait bien être une protéine très voisine de la sous-unité β_2 de la tryptophane-synthétase, possédant le même site d'activation et un site de reconnaissance plus spécifique du groupe - SH que du groupe - OH. Il serait spécialement intéressant de comparer les structures de ces deux enzymes afin de décider si les différences entre la cystéine déhydrase et la tryptophane-synthétase portent sur l'équivalent de la sous-unité β_2 ou sur l'équivalent de la chaine α qui modifie les propriétés de β_2 pour l'orienter soit vers la tryptophane-synthétase, soit vers la cystéine déhydrase.

Les mêmes questions se posent, en particulier en ce qui concerne la L-Sérine déaminase spécifique de E. Coli.

Les réponses éventuelles à ces questions pourraient apporter quelques éclaircissements sur la possibilité qu'un enzyme d'une certaine spécificité dérive d'un enzyme parent, sur l'importance des mutations qui permettent cette évolution, et surtout sur la possibilité de modifier la spécificité d'une protéine donnée par association avec une autre protéine.

BIBLIOGRAPHIE

ARCHIBALD, W.J. (1947) - J. Physical and Colloid Chem. 51, 1204.

BINKLEY, F. (1943) - J. Biol. Chem. 150, 261.

BRAY (1960) - Anal. Biochem. 1, 279.

BUCCI, E. - FRONTICELLI, C. - CHIANCONE, E. - WYMAN, J. - ANTONINI, E. et ROSSI-FANELLI, A. (1965) - J. Mol. Biol. 12, 183.

CARSIOTIS, M. - APPELLA, E. - PROVOST, P. - GERMERSHAUSEN, J. et SUSKIND, S.R. (1965) - Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 877.

CRAWFORD, I.P. et ITO, J. (1964) - Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 51, 330.

CRAWFORD, I.P. et YANOFSKY, C. (1958) - Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 44, 1161.

CREIGHTON, T.E. et YANOFSKY, C. (1966) - J. Biol. Chem. 241, 980.

GALLY, J.A. et EDELMAN, G.M. (1965) - Biochim. Biophys. Acta, 94, 175.

GERHART, J. et SCHACHMAN, H. (1965) - Biochem. 4, 1054.

GOLDBERG, M.E. - CREIGHTON, T.E. - BALDWIN, R.L. et YANOFSKY, C. (1966) - J. Mol. Biol. 20, 71.

GOLDBERG, M.E. et STRYER, L. - Manuscrit en préparation

GUIDOTTI, G. - KOENIGSBERG, W. et CRAIG, L.C. (1963) - Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 50, 774.

HATANAKA, M. - WHITE, E.A. - HORIBATA, K. et CRAWFORD, I.P. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 97, 536.

HENNING, V. - HELINSKY, D.R. - CHAO, F.C. et YANOFSKY, C. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1523.

HUEHNS, E.R. - DANCE, N. - SHOOTER, E.M. et BEAVEN, G.H. (1962) - J. Mol. Biol. 5, 511.

JOHNSTON, J.P. et OGSTON, A.G. (1946) - Trans. Faraday Soc. 42, 789.

KALLIO, R.E. (1951) - J. Biol. Chem. 192, 371.

LA BAR, F.E. (1963) - Dissertation de Thèse, Stanford University.

LA BAR, F.E. et BALDWIN, R.L. (1962) - J. Phys. Chem. 66, 1952.

MARTIN, R.G. et AMES, B.N. (1961) - J. Biol. Chem. 236, 1372.

MC MEEKIN, T.L. et MARSHALL, K. (1952) - Science, 116, 142.

MC MEEKIN, T.L. - WILENSKY, M. et GROVES, M.L. (1962) - Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 151.

METAXAS, M.A. et DELWICHE, E.A. (1955) - J. Bactériol. 70, 735.

MICHAELIS, L. et MENTEN, M.L. (1913) - Biochem. Z. 49, 333.

MONOD, J. - WYMAN, J. et CHANGEUX, J.P. (1965) - J. Mol. Biol. 12, 88.

RINDERKNECHT, H. (1962) - Nature, 13, 167.

SCHACHMAN, H.K. - GROPPER, L. - HANLON, S. et PUTNEY, F. (1962) Arch. Biochem. Biophys. 99, 175.

SMITH, O. et YANOFSKY, C. (1962) - Methods in Enzymol. 5, 799.

SMYTHE, C.V. (1942) - J. Biol. Chem. 142, 387.

TATUM, E.L. et SHEMIN, D. (1954) - J. Biol. Chem. 209, 671.

VERDERAME, M. (1961) - J. Pharm. Sci. 50, 312.

WEBER, G. et LAURENCE, D.J.R. (1954) — Biochem. J. 56, XXXI.

WILSON, D.A. et CRAWFORD, I.P. (1964) - Bact. Proc. 92.

WILSON, D.A. et CRAWFORD, I.P. (1965) - J. Biol. Chem. 240, 4801.

WINKLER, M. (1962) - J. Mol. Biol. 4, 118.

YANOFSKY, C. (1960) - Bacteriol. Revs. 24, 221.

E R R A T U M

Table des matières , 1ère page , ligne 3 :

au lieu de tryptophane de E. Coli
lire tryptophane synthétase de E. Coli

Figures 4, 5 et 7 : diviser par 1 000 les densités optiques portées en ordonnées

Figure 5 : sur l'axe des abscisses, au lieu de 420 m , lire 415 m

Page 35, ligne 12 : au lieu de l'extinction à 415 m ,
lire la longueur d'onde du maximum d'extinction à 415 m

Page 45, ligne 14 : au lieu de $K = 1,45 \cdot 10^{-3} M$ - lire $K = 1,1 \cdot 10^{-3} M$

Page 45, ligne 16 : au lieu de $K_m = 1,1 \cdot 10^{-2} M$ - lire $K_m = 1,45 \cdot 10^{-2} M$

Figure 8 : : surl'axe des abscisses, au lieu de 10^5 , lire $2 \cdot 10^4$

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"Relations entre la séquence d'aminoacides et la structure tridimensionnelle des protéines. Etat de la question".

Vu et approuvé :

Paris, le 30 JANVIER *19* 67

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc. ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

S 1785. — Paris, Imp. Administrative Centrale, 8, rue de Furstenberg (6-61) I 463